



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

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>



**MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE
LA SHBG: IMPLICACIONES EN LA OBESIDAD**

CRISTINA SÁEZ LÓPEZ

TESIS DOCTORAL

Barcelona, 2016

Laboratorio de Diabetes y Metabolismo,

Vall d'Hebron Institut de Recerca

Departamento de Bioquímica y de Biología Molecular,

Universitat Autònoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Celular y Biomedicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE LA
SHBG: IMPLICACIONES EN LA OBESIDAD**

Memoria presentada por

Cristina Sáez López

para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universitat
Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2016



Dr. David Martínez Selva

Director



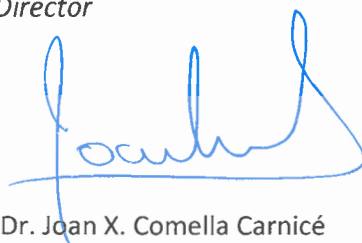
Dra. Cristina Hernández Pascual

Directora



Dr. Rafael Simó Canonge

Director



Dr. Joan X. Comella Carnicé

Tutor



Cristina Sáez López

Doctoranda

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	13
1. LA GLOBULINA TRANSPORTADORA DE ESTEROIDES SEXUALES (SHBG)	15
1.1 Función de la SHBG	15
1.2 Gen de la SHBG	17
1.2.1 Localización, estructura y organización	17
1.2.2 Diferencias en la expresión de la SHBG entre ratones y humanos	17
1.2.3 Ratones transgénicos para la SHBG humana	18
1.2.4 Expresión de la SHBG	20
1.2.4.1 SHBG hepática	20
1.2.4.2 SHBG testicular	23
1.2.4.3 SHBG renal	25
1.2.4.4 SHBG en tejidos y líneas celulares humanas	25
1.3 Estructura proteica de la SHBG	25
1.3.1 Dominios	26
1.3.2 Dimerización	26
1.3.3 Unión a esteroides	27
1.3.4 Unión a metales	28
1.3.5 Glicosilación	28
1.3.6 Homología con otras proteínas	29
1.4 Proteínas que interaccionan con la SHBG	30
1.5 Variación en los niveles plasmáticos de SHBG durante la vida	32
1.5.1 Etapa fetal	32
1.5.2 Tras el nacimiento	33
1.6 Niveles plasmáticos de SHBG y enfermedad humana	35
1.6.1 Obesidad y comorbilidades asociadas	35
1.6.2 Desórdenes tiroideos	36
1.6.3 Esteatosis hepática no alcohólica	37
1.7 Regulación de la SHBG	37
1.7.1 Polimorfismos	37
1.7.1.1 Polimorfismos de nucleótido simple	38
1.7.1.2 Polimorfismo de repetición de la secuencia	

(TAAAA)n en el promotor de SHBG	39
1.7.1.3 Factores de transcripción	40
1.7.2 Regulación por factores metabólicos	42
1.7.2.1 Insulina	42
1.7.2.2 Citoquinas proinflamatorias	44
1.7.3 Regulación nutricional	46
1.7.3.1 Dieta Mediterránea	46
1.7.3.2 Dietas vegetarianas	47
1.7.3.3 Dietas ricas en proteínas	47
1.7.3.4 Dietas ricas en grasas	47
1.7.3.5 Productos cafeinados	47
1.7.3.6 Carbohidratos y palmitato	48
1.7.4 Regulación hormonal	48
1.7.4.1 Esteroides sexuales	48
1.7.4.2 Hormonas tiroideas	49
2. OBESIDAD Y SUS PATOLOGÍAS ASOCIADAS	50
2.1 Definición	50
2.2 Epidemiología	50
2.3 Etiopatogenia de la obesidad	51
2.4 El tejido adiposo como órgano endocrino	52
2.4.1 Adipoquinas proinflamatorias	54
2.4.2 Adipoquinas antiinflamatorias	57
2.4.2.1 Adiponectina	57
2.4.2.2 Regulación de los niveles de adiponectina	58
2.4.2.3 Efectos farmacológicos de la adiponectina	59
2.4.2.4 Relación entre los niveles de adiponectina y SHBG	59
2.5 La obesidad como factor de riesgo para otras patologías	60
2.5.1 Diabetes mellitus tipo 2	61
2.5.2 Trastornos reproductivos	61
2.5.3 Esteatosis hepática no alcohólica	62
2.6 Modelos murinos para el estudio de la obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y esteatosis hepática no alcohólica	63
3. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	65

3.1 La Dieta Mediterránea como patrón nutricional en la prevención de enfermedades cardiovasculares	66
3.1.1 El aceite de oliva: alimento imprescindible en la Dieta Mediterránea	68
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	69
RESULTADOS	73
CAPÍTULO I: Desarrollo de un modelo de ratón doble transgénico, SHBG-C57BL/ksj-db/db, para estudiar la expresión y regulación de la SHBG durante el desarrollo de la obesidad.	75
CAPÍTULO II: La adiponectina aumenta la producción de SHBG hepática: mecanismos moleculares e implicaciones.	91
CAPÍTULO III: El ácido oleico incrementa la producción de SHBG hepática en hombres	107
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	141
ANEXO	169

ABREVIATURAS

µg/ml	Microgramos/ mililitro/ Micrograms/mililiter
ACC	Acetil-coenzima A carboxilasa/ Acetyl-coenzyme A carboxylase
ACLY	ATP-citrato liasa/ ATP cytrate lyase
AdipoR1	Receptor de adiponectina 1/ Adiponectin receptor 1
AdipoR2	Receptor de adiponectina 2/ Adiponectin receptor 2
ADN	Ácido desoxirribonucléico/ Desoxirribonucleic acid
AFP	Alfa-fetoproteína/ Alpha-phetoprotein
Ala	Alanina/Alanine
AMP	Adenosín monofosfato/ Adenosin monophosphate
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico/ Cyclic adenosin monophosphate
AMPK	Quinasa activa por monofosfato de adenosina/ Adenosin monophosphate-activated protein kinase
ANGPTL2	Proteína similar a angiopietina 2/ Angiopietin-like protein 2
Arg	Arginina/ Arginine
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asn	Asparagina/ Asparagine
Asp	Aspártico/ Aspartic
ATP	Adenosín trifosfato
Ca	Calcio/ Calcium
CCL2	Ligando de quimiocina 2/Chemokine (C-C motif) ligand 2
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina/ Chromatin immunoprecipitation
COUP-TF	Factor de transcripción de ovoalbúmina de pollo/ Chicken ovoalbumin upstream transcription factor
CREB	Proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc/ cAMP receptor element-binding
Cyp2d6	Citocromo P450 2D6/ Cytochrome P450 2D6
Cyp3a4	Citocromo P450 3A4/ Cytochrome P450 3A4
Cyp7a1	Colesterol 7 alfa-hidroxilasa/ colesterol 7 alpha-hydroxylase
DHT	Dihidrotestosterona/ Dihydrotestosterone
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DNasa	Desoxirribonucleasa/ Desoxirribonuclease
ECV	Enfermedad cardiovascular
ER	Receptor de estrógenos/ Estrogen receptor
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas/ Fas-associated death domain

ABREVIATURAS

FAS	Ácido graso sintasa / Fatty acid synthase
FP	Sitio hipersensible a DNasa I/ Footprint
G6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa/ Glucose-6-phosphatase
Gas6	Proteína específica de arresto de crecimiento 6/Growth Arrest Specific 6
hCG	Gonadotropina coriónica humana/ Human chorionic gonadotropin
HDL	Lipoproteína de alta densidad/ High density lipoprotein
HNF-3	Factor nuclear 3 del hepatocito/ Hepatocyte nuclear factor 3
HNF-4 α	Factor nuclear 4 alfa del hepatocito/ Hepatocyte nuclear factor-4 alpha
HOMA	Modelo de evaluación de homeostasis/ Homeostatic model assessment
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo I/ Insulin-like growth factor 1
IKK	Quinasa inhibidora de la quinasa del factor kappa β / Inhibitor of κ B kinase
IL-18	Interleuquina 18/ Interleukin 18
IL-1R	Receptor de interleuquina 1/ Interleukin 1 receptor
IL-1RA	Antagonista del receptor de interleuquina 1/ Interleukin 1 receptor antagonist
IL-1 α	Interleuquina 1 alfa/ Interleukin 1 alpha
IL-1 β	Interleuquina 1 beta/ Interleukin 1 beta
IL-6	Interleuquina 6/ Interleukin 6
IMC	Índice de masa corporal
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal/ c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobase
kDa	kilodalton
kg	Kilogramo
KLK	Peptidasa relacionada con la kalikreína/ Kallikrein related protein
KO	Knockout
LDL	Lipoproteína de baja densidad/ Low density lipoprotein
Lep	Leptina/ Leptin
Lepr	Receptor de la leptina/ Leptin receptor
Leu	Leucina/ Leucine
LG	G-laminina/ G-Laminin
LH	Hormona luteinizante/ Luteinizing hormone
m ²	Metros al cuadrado
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCF-7	Fundación del cáncer de Michigan 7/ Michigan Cancer Foundation-7
MEK	Quinasas de las proteínas quinadas activadas por mitógenos/ Mitogen-activated

	protein kinase kinase
Met	Metionina/ Methionine
MTP	Proteína microsomal transportadora de triglicéridos/ Microsomal triglyceride transfer protein
MUFA	Grasa monoinsaturada/ Monounsaturated fatty acid
NAFLD	Esteatosis hepática no alcohólica/ Non-alcoholic fatty liver disease
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas/ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIK	Quinasa inductora de NF-κβ/ NF-κβ inducing kinase
nM	nanomolar
NR2A1	Receptor nuclear de la subfamilia 2, grupo A, miembro 1/ Nuclear receptor family 2, group A, member 1
OECD	Organización para la cooperación y el desarrollo económicos/ Organization for economic cooperation and development
OMS	Organización mundial de la salud
PCOS	Síndrome de ovario poliquístico/ Polycystic ovarian syndrome
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa/ Phosphoenolpyruvate carboxykinase
Phe	Fenilalanina/ Phenylalanine
PKA	Proteín kinasa A/ Protein kinase A
PKLR	Isoenzimas de piruvatoquinasa de hígado y 9glóbulos rojos/ Pyruvate kinase, liver and RBC
PPARγ	Receptor gamma activado por los proliferadores del peroxisoma/ Peroxisome proliferator activated receptor gamma
Pro	Prolina/ Proline
PSA	Antígeno específico de próstata/ Prostate specific antigen
PUFA	Grasa poliinsaturada/ Polyunsaturated fatty acid
RBP4	Proteína transportadora de retinol tipo 4/ Retinol binding protein 4
rSHBG	Receptor de la SHBG/ SHBG receptor
SCD-1	Estearoil-coenzima A desaturasa 1/ Stearoyl-coenzyme A desaturase 1
SFA	Grasa saturada/ Saturated fatty acid
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales/ Sex hormone-binding globulin
SHIP	Estudio de salud en Pomerania/ Study of health in Pomerania
siRNA	ARN de interferencia pequeño/ Small interference RNA
SNP	Polimorfismos de nucleótido simple/ Single nucleotide polymorphism

ABREVIATURAS

SREBP1	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1/ Sterol regulatory element-binding protein 1
T3	Hormona triyodotironina/ Triiodothyronine hormone
T4	Tiroxina/ Thyroxine
Thr	Treonina/ Threonine
TNF-R	Receptor de TNF α / TNF α receptor
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa/ Tumor necrosis factor alfa
TRADD	Dominio de muerte asociado al TNF-R1/ TNF-R1-associated death domain
TRAF	Factor de transcripción asociado a TNF-R/ TNF-R associated factor
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor de TNF- α / TNF- α receptor-associated factor 6
TRIP	Vía independiente de TRAF/ TRAF independent pathway
USF	Factor estimulador <i>upstream</i> / Upstream stimulatory factor
UTR	Región no traducida/ Untranslated región
Val	Valina/ Valine
WHtR	Índice cintura-cadera/ Waist-to-hip ratio
Zn	Zinc

INTRODUCCIÓN

1. LA GLOBULINA TRANSPORTADORA DE HORMONAS SEXUALES (SHBG)

1.1 FUNCIÓN DE LA SHBG

Los esteroides sexuales, andrógenos y estrógenos, controlan varios aspectos de la diferenciación sexual, el desarrollo de las gónadas y el crecimiento y maduración de los tejidos reproductivos [1,2]. También son los responsables de modular el comportamiento sexual y el éxito reproductivo. Los esteroides sexuales se producen en las gónadas, las glándulas adrenales y la placenta y tienen que ser transportados por la sangre hasta sus tejidos diana [2]. Para ello, requieren de proteínas transportadoras, como la albúmina, la más abundante en plasma, que une los esteroides inespecíficamente y con baja afinidad [1] y la proteína transportadora de esteroides sexuales o “Sex Hormone-Binding Globulin” (SHBG).

La SHBG es una glicoproteína [3] producida por el hígado humano y de otros vertebrados que se secreta a la circulación sanguínea [4,5]. Fue identificada en los años 60 como una β -globulina del plasma que unía testosterona, dihidrotestosterona y 17 β -estradiol [6-10]. Mediante diferentes técnicas bioquímicas, como la de adsorción de testosterona en carbón activo [6,7,10-12], filtración en gel *Sephadex* [6,10,12], diálisis [7,10] o electroforesis [6,8,9], se demostró que esta β -globulina unía esteroides sexuales con gran afinidad, en el orden de nanomolar, lo que representaba cinco órdenes de magnitud mayor que la afinidad de la albúmina. La dihidrotestosterona es el esteroide sexual por el que más afinidad muestra la SHBG, seguido de la testosterona y muestra una afinidad más baja por el estradiol [11].

La gran afinidad de la SHBG por los esteroides sexuales le hace ser la principal proteína transportadora de esteroides biológicamente activos, regulando su biodisponibilidad en la circulación sistémica y modulando su accesibilidad a nivel de tejido [13]. El porcentaje de esteroides sexuales libres en plasma es sólo de entre el 1 y el 3%, otra parte se encuentra unido a albúmina y mayoritariamente a SHBG. Por esto la medida de los niveles de SHBG circulante proporciona una estimación de los esteroides sexuales libres en el torrente circulatorio [14].

Se ha detectado la presencia de SHBG en la sangre de varias especies de vertebrados [15-17]. En primates se encarga de la unión de andrógenos y estrógenos [18]. En conejos, sin embargo, la SHBG sólo une andrógenos [19] y los roedores no poseen SHBG en plasma, ya que sólo se expresa en el hígado de forma transitoria durante la etapa fetal y durante la vida adulta en las células de Sertoli de los testículos [16].

El mecanismo por el cual la SHBG transporta los esteroides sexuales a los tejidos diana y cuál es la fracción biodisponible de estos que lleva a cabo su acción a nivel de célula diana ha sido objeto de debate, ya que se han propuesto diferentes teorías. Por un lado, en 1989 Mendel defendió su teoría de la hormona libre, con lo que únicamente la fracción de hormonas que no se encuentran unidas a SHBG podría entrar en la célula diana por difusión y es, por tanto, biológicamente activa [20] (Figura 1).

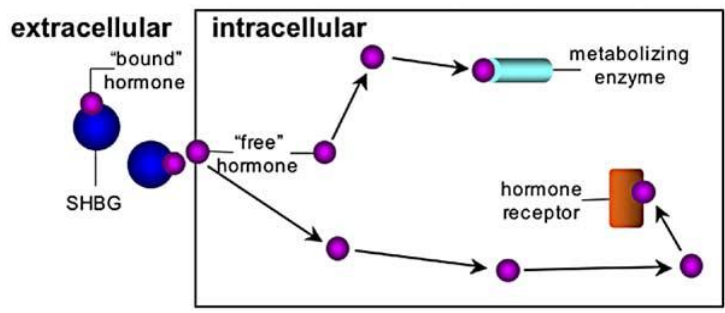


Figura 1. Interacción célula-esteroide según el modelo de la hormona libre. Extraído de Adams JS, 2005 [21].

Por otro lado, en 2005, Hammes y col. propusieron que la fracción biológicamente activa sería la de los esteroides sexuales unidos a la SHBG [22]. Según este modelo, el complejo SHBG + esteroide sexual interacciona con megalina, siguiendo una serie de pasos, que se representan en la figura 2: el primero (1), sería la interacción de la SHBG circulante que lleva unido el esteroide sexual a la megalina integrada en vesículas recubiertas de clatrina en la membrana plasmática de la célula diana [23]. En segundo lugar (2), tendría lugar la formación de una vesícula endocítica, que envuelve el complejo SHBG + esteroide, unido a megalina. Por último (3), se produciría la disociación de la SHBG del esteroide dentro de la vesícula, supuestamente a través de la acidificación del lumen de la vesícula [24]. Después, los esteroides sexuales tendrían que salir de la vesícula para encontrar su destino intracelular, lo cual según la hipótesis de la hormona libre, ocurriría por difusión (Figura 2). También podría ocurrir a través de intermediarios transportadores que lleven al esteroide hasta su destino [25,26].

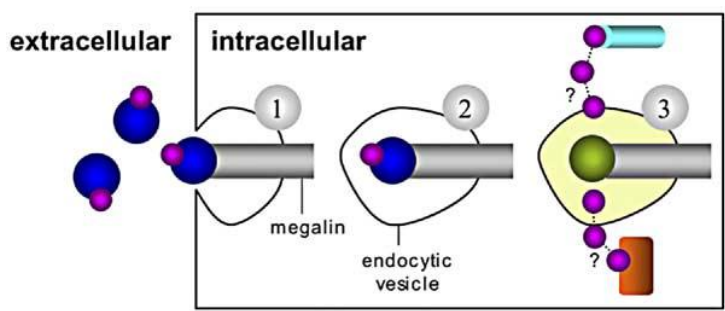


Figura 2. Interacción célula-esteroide según el modelo dependiente de unión a SHBG y megalina. La SHBG se muestra en azul y los esteroides en rosa. Extraído de Adams SJ, 2005 [21].

1.2 GEN DE LA SHBG

1.2.1 Localización, estructura y organización

El gen de la SHBG humana (*shbg*) se localiza en la región p12-p13, en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) y ocupa un total de 13 kilobases (kb). Su región codificante se extiende a lo largo de 3,2 kb de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico [27] y está compuesta por ocho exones, separados por siete pequeños intrones y da lugar al menos a diecinueve unidades de transcripción [28], que tienen en común la región correspondiente a los exones 2-8, mientras que el exón 1 puede proceder del promotor proximal o de uno de los promotores alternativos [29] (Figura 3).

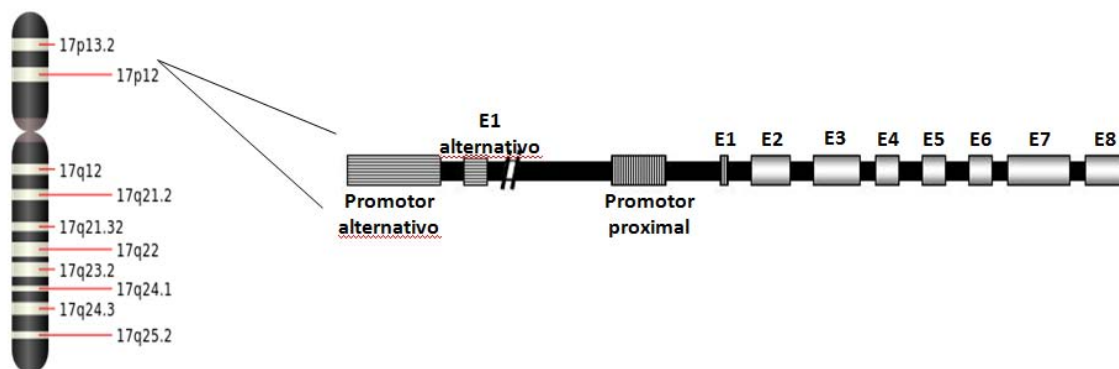


Figura 3. Esquema de la localización del gen de la SHBG humana dentro del cromosoma 17 y estructura del mismo.

El sitio principal de producción de SHBG son los hepatocitos [5]. Sin embargo, se ha descrito la presencia de transcritos de la SHBG en otros tejidos, como los testículos, la próstata, el ovario, endometrio, la placenta, la mama o el hipotálamo. Para llevar a cabo este complejo control transcripcional de la SHBG, se conocen tres promotores: PL, PN y PT, expresados de forma diferencial en varios tejidos humanos [28].

1.2.2 Diferencias en la expresión de la SHBG entre ratones y humanos

A diferencia de otros mamíferos, los roedores sólo expresan SHBG en el hígado de forma transitoria durante la etapa fetal tardía, por lo cual no tienen SHBG en la circulación sistémica [15,30]. Esto se debe a una diferencia evolutiva de expresión y función de la SHBG.

Los roedores expresan en el testículo la proteína transportadora de andrógenos murina o SHBG murina. Esta proteína es homóloga a la SHBG humana, compartiendo con ella la secuencia de aminoácidos pero con una ligera diferencia en la glicosilación [31,32]. En cuanto al sitio de expresión,

mientras que la SHBG humana es producida principalmente por el hígado, y también en los testículos por las células germinales, la SHBG murina es producida por las células de Sertoli de los tubos seminíferos de los testículos y es secretada al fluido luminal [33]. Desde ahí se transporta al epidídimo con el espermatozoide en maduración, siendo allí internalizada por las células epiteliales [34]. La SHBG testicular ha sido utilizada como marcador de la función de las células de Sertoli, ya que su concentración varía en función de la estimulación hormonal de los túbulos seminíferos durante los estadios espermatogénicos [34].

Funcionalmente, la SHBG murina también se diferencia de la SHBG humana en que se encarga de regular la espermatogénesis y la maduración del espermatozoide manteniendo altos niveles de andrógenos en el testículo y el epidídimo [33].

Esta expresión diferencial de la SHBG murina con respecto a la SHBG humana está relacionada con la evolución del promotor, específicamente con la aparición de una región conocida como “footprint 4” (FP4) [35], como se explicará en un apartado posterior. La aparición de este FP4 en humanos ha dado lugar a la expresión de la SHBG en las células germinales y en el hígado y a un cambio en su función, pasando a controlar la biodisponibilidad de los esteroides sexuales y su accesibilidad a nivel de tejido.

Organismo	Ratones	Humanos
Sitios de expresión	Células de Sertoli de los testículos	-Hígado, riñón -Células germinales de los testículos
Función	Regular la espermatogénesis, transportando la testosterona hasta el epidídimo para la correcta maduración del espermatozoide.	-En el hígado, controlar biodisponibilidad de esteroides sexuales -En los testículos, regular espermatogénesis. La isoforma de SHBG en el espermatozoide podría influir en la motilidad de los espermatozoides y en la calidad del espermatozoide.
Diferencia génica	No FP4 en el promotor proximal	FP4 en el promotor proximal

Tabla 1. Diferencias en la expresión de SHBG entre ratones y humanos.

1.2.3 Ratones transgénicos para la SHBG humana

Las diferencias de expresión de SHBG entre ratones y humanos constituye una limitación para estudiar la regulación de la SHBG *in vivo* ya que los ratones, al no expresar la SHBG en el hígado,

no tienen SHBG en la sangre. Únicamente durante el desarrollo fetal los ratones expresan SHBG en el hígado y la secretan a la sangre.

Para solventar este problema, en 1998 se desarrollaron ratones transgénicos para la SHBG humana [36]. Se generaron varias líneas de estos ratones transgénicos mediante inserción por microinyección en los núcleos de embriones de ratón de transgenes de 4,3 kb y 11 kb del gen de la SHBG humana. Los transgenes de 4,3 kb contenían la región codificante compuesta por los ocho exones a la que se sumaba una parte del ADN flanqueante de la región 5' de 0,9 kb, correspondiente al promotor proximal. En cuanto a los transgenes de 11 kb, constaban de los ocho exones de la región codificante y de un fragmento de 5 kb de la región 5', que contiene secuencias que se encuentran en varios transcritos de SHBG alternativos identificados en los testículos humanos [36].

Ambos tipos de ratones expresan la SHBG humana en el hígado y la secretan a la sangre. Durante la etapa fetal, la expresión de SHBG humana en estos ratones se dio tanto en los hepatocitos como en las células epiteliales del duodeno [37]. Tras el nacimiento, en los ratones en cuyo genoma se había insertado tanto el transgén de 4,3 kb (ratones shbg4) como el transgén de 11 kb (ratones shbg11) se encontró expresión de SHBG humana en el hígado, concretamente en el citoplasma de los hepatocitos, y en el riñón, en el citoplasma de las células epiteliales de revestimiento de los túbulos contorneados proximales (Figura 4). En ambos órganos, la transcripción del gen de la SHBG humana se realiza bajo el control de su propio promotor [36].

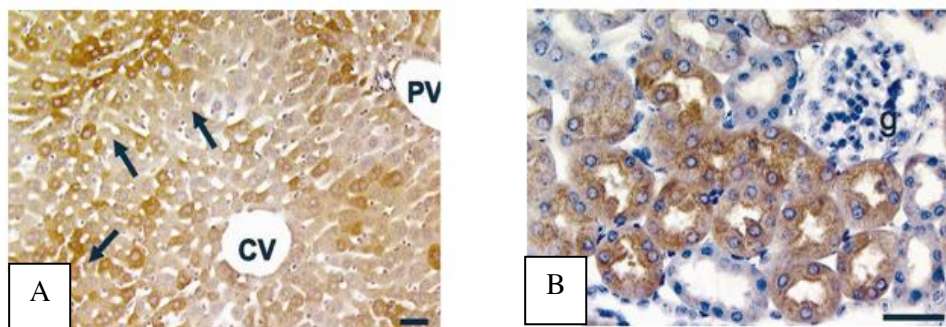


Figura 4. SHBG inmunoreactiva en el hígado (A) y el riñón (B) de los ratones transgénicos para la SHBG. Extraído de Jänne M & Hammond GL, 1998 [36].

En los ratones en los que se introdujo el transgén de 11 kb, se encontró expresión de SHBG humana en los testículos y se observó que la expresión de este transgén varía en función del estado del ciclo espermatogénico, viendo disminuidos sus niveles en los estadios I-III y con un aumento progresivo hasta el estadio VII. Después del estadio IX se reduce la presencia de estos transcritos,

aunque se acumulan en la región abluminal de las células de Sertoli durante los estadios X-XIII [36] (Figura 5).

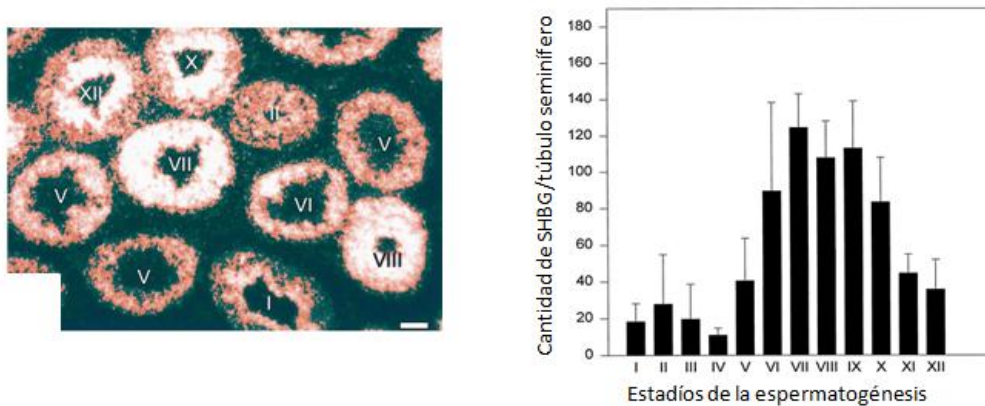


Figura 5. Presencia de SHBG en los diferentes estadios espermatogénicos. Adaptado de Jänne M & Hammond GL, 1998 [36].

Fenotípicamente, los ratones *shbg4* y *shbg11* son similares a los ratones *wild-type* en cuanto a peso total y peso de órganos como el testículo, el hígado o el riñón. La morfología y cantidad de espermatozoides, la histología de los órganos sexuales accesorios así como la fertilidad tampoco están alteradas en los ratones transgénicos para la SHBG humana con respecto a los ratones *wild-type* [36].

Mediante el estudio de estos ratones transgénicos para la SHBG se ha podido entender la función de la SHBG y su impacto sobre la actividad biológica de los esteroides sexuales, así como estudiar las unidades de transcripción implicadas en su expresión en los diferentes tejidos y analizar su regulación por diversos factores.

1.2.4 Expresión de la SHBG

1.2.4.1 SHBG hepática

En el hígado, la SHBG se expresa como un transcrito compuesto por los exones 1-8 [27]. El exón 1 presente en esta unidad de transcripción es el único de los exones 1 de las diferentes unidades de transcripción que presenta un codón ATG en marco de lectura con la secuencia que codifica la SHBG, por tanto, el único que codifica el polipéptido de 29 aminoácidos correspondiente al péptido señal [38]. Al traducirse, el péptido señal se desprende y la proteína se secreta a la sangre, donde circula como proteína homodimérica glicosilada de 92,5 kDa [38], como se explicará más adelante.

En el gen de la SHBG, los dominios responsables de la unión a esteroide y de la dimerización están codificados por secuencias de los exones 3 y 4 [39-42] y el dominio de unión de la SHBG a su receptor está codificado por una secuencia que se encuentra en el exón 3 [43-45]. En la secuencia del transcrito maduro de la SHBG también se encuentran sitios de glicosilación: un sitio de O-glicosilación en el aminoácido treonina 7 (Thr7) y dos sitios de N-glicosilación en los residuos de asparagina (Asn) en las posiciones 351 y 367 (Asn351 y Asn367) [44,45] (Figura 6).

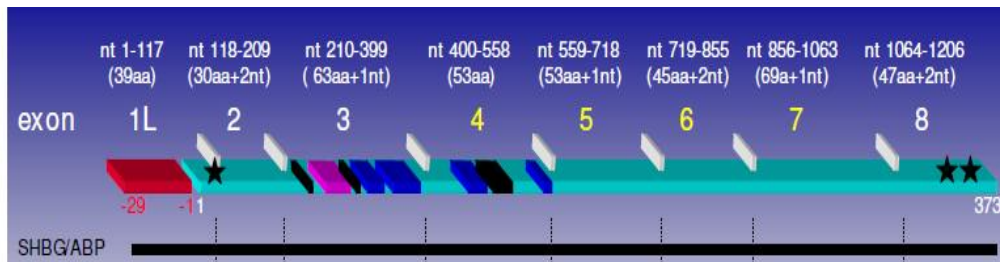



Figura 6. Diagrama del transcrito de la SHBG procedente del promotor proximal. En rojo se muestra el péptido señal; en negro el dominio de unión a esteroide; en azul el dominio de dimerización; en morado la secuencia de unión al receptor; y los símbolos  representan los sitios de glicosilación. Adaptado de Nakhla y col., 2009.

-Promotor proximal de la SHBG

En el hígado, la expresión de la SHBG está regulada por el promotor proximal, consistente en una región localizada a unos 850 pares de bases del exón 1, que carece de la caja TATA (TATA-box, en inglés) tradicional [4]. Este promotor es capaz de dirigir la expresión de la SHBG fetal y adulta al hígado y al riñón en los ratones transgénicos para la SHBG [37].

Mediante estudios de “DNasa footprinting” con extractos nucleares de SHBG hepática, se han definido al menos 17 elementos reguladores que actúan en “cis”, a los que se ha llamado regiones FP (footprinting) [46] (Figura 7).

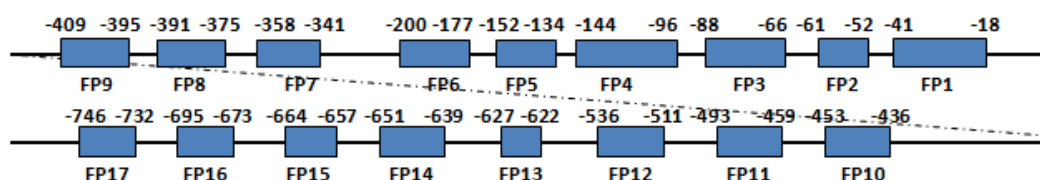


Figura 7. Regiones FP identificadas y posiciones que ocupan en el promotor de la SHBG humana.

Las regiones FP del promotor proximal de la SHBG humana que han mostrado tener la actividad máxima en HepG2 son aquéllas del FP1 al FP4, es por ello que es a las que se ha prestado

una mayor atención en términos de descripción de secuencia y sitios de unión a factores de transcripción. Se han caracterizado los FP1, FP3 y FP4 (Figura 8).

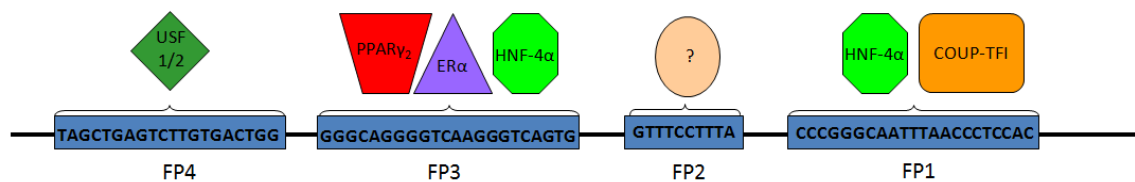


Figura 8. Esquema de los FP1, FP2, FP3 y FP4 del promotor de la SHBG. Adaptado de Simó R y col., 2015 [47].

La región FP1 es una región rica en TA que contiene la secuencia TTTAAC, que parece sustituir a la caja “TATA-box”. La FP1 contiene sitios de unión para los factores de transcripción nuclear 4 alfa del hepatocito (HNF-4 α) [46], y los factores de transcripción de ovoalbúmina de pollo COUP-TFs [46,48], que son los responsables de la transcripción basal del gen de la SHBG. La unión de HNF-4 α al FP1 constituye el factor regulador clave de la expresión de la SHBG, actuando como inductor de su activación transcripcional. La unión de COUP-TF al FP1, por su parte, antagoniza esta activación [46].

La región FP3 consta de sitios de unión para el receptor activado por los proliferadores del peroxisoma, conocido como PPAR γ y también para HNF-4 α y COUP-TF [46,49]. La unión de estos últimos a FP3 contribuye a una regulación adicional de la transcripción de la SHBG en respuesta a la regulación positiva o negativa del HNF-4 α . La unión de PPAR γ por su parte, da lugar a una reducción de la expresión del gen de la SHBG [49]. A esta región también se le puede unir el receptor de estrógenos ER α [50].

En la región FP4 se ha observado que hay sitios de unión a los factores de transcripción “Upstream stimulatory factor” USFs. Sin embargo, la unión de estos al FP4 no es indispensable para la expresión hepática de la SHBG, ya que los ratones transgénicos que expresan SHBG sin este sitio de unión a USF mantienen un nivel elevado de expresión de SHBG en el hígado [35].

Las regiones FP2, FP5 y FP6 se han identificado como posibles sitios de unión a otros factores de transcripción, pero aun no han sido caracterizadas.

En función del estado nutricional y metabólico de la célula, se produce la unión de unos u otros factores de transcripción a las regiones FP del promotor de la SHBG, regulando así su expresión. Cuando se encuentra unido HNF-4 α y USFs a los FPs se da lugar a la activación de la transcripción de la SHBG, lo que se traduce en altos niveles de la proteína secretada mientras que

cuando los FP están ocupados por PPARy o los COUP-TFs se produce una represión de la expresión de la SHBG, con los consiguientes niveles bajos de secreción de la proteína (Figura 9).

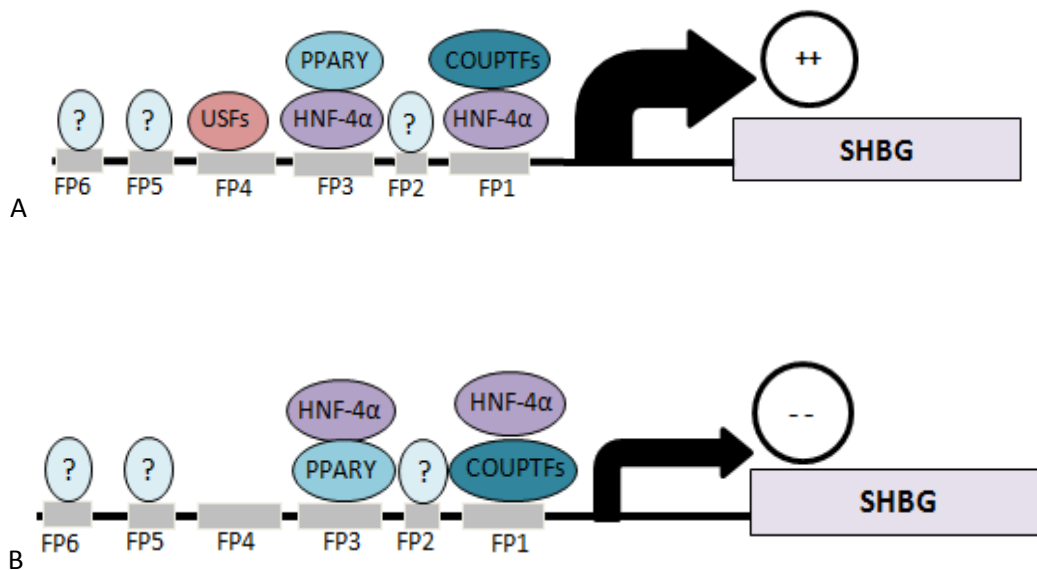


Figura 9. Imágenes representativas de un estado en el que las regiones FP del promotor están ocupadas por factores de transcripción que activan la expresión del gen de la SHBG: HNF-4α y USFs (A) o por factores de transcripción que la inhiben: COUP-TFs y PPARy (B).

En la regulación de la SHBG hepática es importante también una secuencia *Alu* existente en el promotor de la SHBG. En estudios en la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2, se ha encontrado que esta secuencia *Alu* contiene una repetición en tándem $(TAAAA)_n$, que se encuentra entre las posiciones -697/-727 del promotor proximal [51]. Esta secuencia *Alu* modula la expresión de SHBG tanto *in vitro* (células HepG2) [51] como *in vivo* (en humanos), lo que será brevemente explicado en otro apartado.

1.2.4.2 SHBG testicular

El testículo también es un sitio de producción de SHBG muy importante, tanto en humanos como en roedores y otros mamíferos. Mientras que los roedores expresan el gen de la SHBG en las células de Sertoli de los testículos, los humanos expresan la SHBG en las células germinales [35,52]. Esta expresión diferencial de la SHBG en testículos entre roedores y humanos está relacionada con la aparición a lo largo de la evolución de la región FP4 del promotor proximal y de un promotor alternativo.

-Región FP4 del promotor proximal: Mediante análisis filogenético del promotor proximal de la SHBG de varias especies, se observó que la región FP4, presente en humanos y en chimpancés, no está presente en el promotor proximal de otras especies, incluyendo los roedores [35]. Sin embargo, la región FP4 del promotor proximal de la SHBG, sí está presente en los ratones transgénicos para la SHBG humana. En ellos, se ha observado que el sitio de unión de USF a esta región suprime la expresión de la SHBG en las células de Sertoli. Así, la delección del sitio de unión a USF en el FP4 de los ratones transgénicos para la SHBG *shbg4* dio lugar a la expresión de la SHBG en las células de Sertoli [35].

-Promotor alternativo: La expresión de la SHBG en las células germinales de los testículos en humanos está regulada por un promotor alternativo específico de testículo, que da lugar a una unidad de transcripción con un exón 1 alternativo y en el que están ausentes las 208 pares de bases correspondientes al exón 7 [53] (Figura 10). Este promotor es distal, ya que sólo los ratones transgénicos con la secuencia de 11 kb y no aquéllos con la secuencia de 4 kb, que sólo tienen el promotor proximal, expresan SHBG con este transcrito alternativo [53]. El exón 1 alternativo está localizado unas 2kb *upstream* del exón 1 de la unidad de transcripción de la SHBG del hígado y no contiene la metionina (Met) que inicia la transcripción, sino que el codón de inicio en estos transcritos está situado en la Met30 [4]. Se genera por tanto una proteína truncada en el extremo N-terminal, de menor tamaño que la plasmática, que no posee la secuencia del péptido señal y por tanto, no se secreta, sino que se mantiene dentro de la célula, acumulándose dentro del acrosoma de espermátidas y el espermatozoide maduro [53]. Además, como ya se ha mencionado, este transcrito alternativo sufre “splice” en el exón 7, produciendo una terminación prematura en la que los 188 aminoácidos del C-terminal de la SHBG pasan a ser 9 [54]. Esta isoforma de la SHBG del espermatozoide puede unir esteroides sexuales y su concentración en los espermatozoides correlaciona con la motilidad del espermatozoide y disminuye con la edad [55].

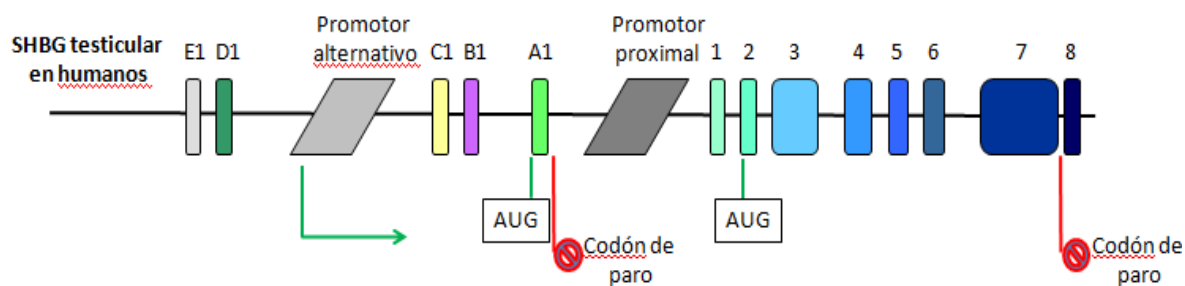


Figura 10. Esquema representativo de los elementos implicados en la expresión de la SHBG en el testículo en humanos.

1.2.4.3 SHBG renal

Los ratones transgénicos para la SHBG expresan el transgén de la SHBG también en el riñón, el cual está regulado directamente por el promotor proximal [36], aunque su regulación es diferente a la de la SHBG hepática. La localización de los transcritos de SHBG en este tejido corresponde a las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales, y la proteína se ha encontrado también en la orina. Estos ratones transgénicos presentan dimorfismo sexual en la expresión de SHBG en riñón, ya que en etapas previas a la pubertad presentan bajos niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de SHBG mientras que después hay un incremento importante, en paralelo con un aumento con la producción de andrógenos durante la maduración sexual [37].

1.2.4.4 SHBG en tejidos y líneas celulares humanas

En humanos, como ya se ha mencionado, se ha encontrado expresión de SHBG en tejidos que responden a hormonas como la próstata [29,56], la placenta [57] o el endometrio, tanto sano como canceroso [58,59]. También en el ovario canceroso [60,61], en tejidos mamarios cancerosos [62], las trompas de Falopio [63], así como en cardiomiocitos [64]. En algunos casos, como Noe (1999) y Hryb y col. (2002), han mostrado evidencia de traducción de ese ARNm [56,63].

La SHBG ha sido identificada también en el hipotálamo, el infundíbulo cerebral y en el fluido cerebroespinal [65]. Asimismo, se ha encontrado SHBG en la saliva, en concentraciones que corresponden a un 0,1% aproximadamente a la concentración de SHBG plasmática. Esta fracción de SHBG podría pasar del torrente circulatorio a la saliva de forma inespecífica, influenciando el contenido en esteroides de la saliva bajo determinadas circunstancias fisiológicas [66].

En cuanto a las líneas celulares, se ha encontrado ARNm de SHBG en líneas celulares de cáncer de próstata y cáncer de mama [38,56,67].

1.3 ESTRUCTURA PROTEICA DE LA SHBG

La forma precursora de la SHBG consiste en un péptido señal de secreción de 29 aminoácidos seguido por una secuencia de 373 residuos [45,54], que tras sufrir modificaciones post-transcripcionales como son la O-glicosilación y N-glicosilación [68,69] se convierte en su forma madura. La SHBG circulante es una proteína de 92,5 kDa, homodimérica, con tres cadenas de carbohidratos unidas a cada subunidad [45].

Estudios de cristalización han permitido determinar sus dominios, sitios de unión a esteroide y a metales, así como los cambios conformacionales producidos por estas uniones. La cristalización del homodímero se ha conseguido de momento sólo con esteroide unido, ya que esta unión estabiliza la formación del dímero [70].

1.3.1 Dominios

Cada monómero está compuesto por repeticiones en tándem de dominios similares a G-laminina (LG) (G-laminin like). Se pueden diferenciar los dominios N-terminal y C-terminal [41,70,71].

El dominio N-terminal o LG4, que comprende los residuos 1-194, incluye el dominio responsable de la dimerización [72], el dominio de unión a esteroides, tres sitios de unión a cationes divalentes y un sitio de O-glicosilación en el aminoácido Thr⁷ [70]. En cuanto al dominio C-terminal, conocido como LG5, que comprende los residuos 195-373, consta de dos sitios altamente conservados de N-glicosilación, de tipo N-acetilactosamina en los aminoácidos Asn³⁵¹ y Asn³⁶⁷. [41,54,73]. También en el dominio N-terminal se encuentra la secuencia de unión a su receptor, compuesta por los aminoácidos TWDPEGVIFY y que es la región más conservada de la molécula entre especies y proteínas relacionadas [43] (Figura 11).

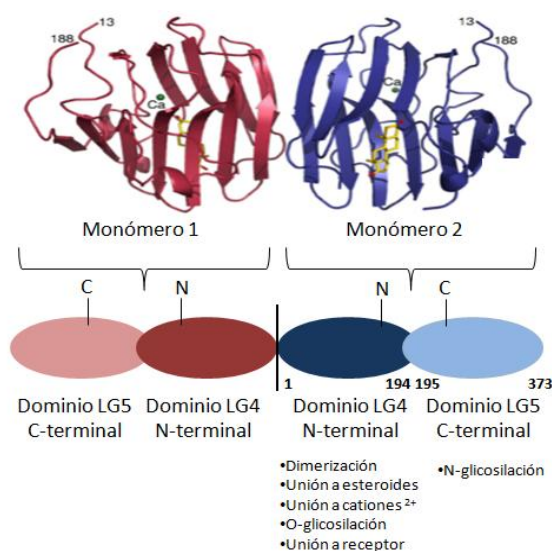


Figura 11. Representación gráfica de los dominios presentes en cada monómero de SHBG. Adaptada de Avvakumov et al, 2010.

1.3.2 Dimerización

Como ya se ha mencionado, en la sangre la SHBG existe como homodímero [74,75]. Mediante experimentos de cristalización de la estructura de la SHBG, se ha observado que en el

proceso de dimerización, el área de contacto entre los monómeros es predominantemente hidrofóbico y en él se encuentran residuos conservados filogenéticamente como los de alanina 85 (Ala85), leucina 87 (Leu87), valina 89 (Val89), Leu122, Leu124, Ala91 y Val121 [76]. Alrededor de ellos se producen interacciones polares que implican a los residuos aspártico 73 (Asp73) y arginina 125 (Arg125) [41]. En la estabilización del homodímero influye tanto la unión de sus ligandos esteroides [77] como la unión de cationes de calcio (Ca^{2+}). A su vez, la dimerización se requiere para la integridad del sitio de unión a esteroide del dímero [39].

1.3.3 Unión a esteroide

Los sitios de unión a esteroides son hidrofóbicos y se encuentran cerca del centro del dominio N-terminal de cada monómero, intercalándose en el hueco hidrofóbico formado entre dos hojas β [41]. En ellos, los esteroides se unen mediante interacciones polares y sobre todo hidrofóbicas, siendo los residuos fenilalanina 67 (Phe67), metionina 107 (Met107) y Met139 los principales contribuyentes a los contactos hidrofóbicos. La unión del estradiol y la testosterona (y sus derivados) a estos sitios de unión se produce en orientaciones opuestas (Figura 12). Así, en función del ligando que se une varía la conformación de un “loop” flexible que se encuentra situado por encima del sitio de unión a esteroides [70,78]. Se ha observado que la estructura molecular que mejor encaja en el sitio de unión a esteroide es la 5- α dihidrotestosterona (5 α -DHT) [70].

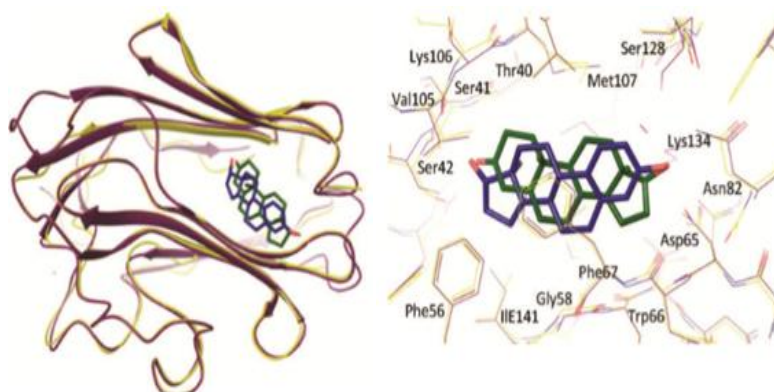


Figura 12. Representación del sitio de unión a esteroide en el que se muestra la unión de una molécula de estradiol (azul) o de una molécula de testosterona (verde). Extraído de Grishkovskaya I et al, 2000 y Grishkovskaya I et al, 2002.

En la primera estimación acerca del número de moléculas de esteroide que se unen a la proteína homodimérica se propuso que en cada monómero de SHBG se produce la unión de un esteroide [75]. Más tarde, otros datos revelaron que quizá sólo se unía un esteroide al dímero porque el sitio de unión a esteroide se encuentra cerca de la interfase de dimerización, de manera que la unión de un esteroide a un monómero impedía la entrada de otro esteroide al sitio de unión

del otro monómero [39]. Posteriormente, mediante estudios de cristalización de la SHBG homodimérica se ha observado que la distancia entre ambos sitios de unión no es tan pequeña y que en ambos monómeros se encuentra unido esteroide [41,70].

Además de la unión a esteroides, en el último año se ha descrito la unión de varios compuestos disruptores endocrinos, de los que se había observado su unión al receptor de estrógenos, al receptor de andrógenos o a la proteína alfa-fetoproteína (AFP) de rata. Entre estos compuestos, se encuentran, además de compuestos químicos esteroideos, flavanonas, calconas, ftalatos, derivados de difenilmetano, bibenzilos, parabenos, derivados estilbenos, difeniletlenos o benzofenonas [79]. Esta unión de disruptores endocrinos a la SHBG podría implicar una posible función de la SHBG en detoxificación.

1.3.4 Unión a metales

En cada monómero de SHBG se han identificado tres sitios de unión a metales, que se encuentran en el dominio N-terminal; uno de ellos se encarga de coordinar la unión a Ca^{2+} y otros dos sitios unen cationes de zinc (Zn^{2+}). La unión de Ca^{2+} estabiliza la globulina N-terminal para la formación del dímero [39,41]. En cuanto a los sitios de unión a Zn^{2+} , uno de ellos está localizado cerca de la interfaz del dímero y contribuye también a estabilizar su formación [73].

El otro sitio de unión a Zn^{2+} es próximo al sitio de unión a esteroide y en él se ha observado que la unión del Zn^{2+} produce un cambio conformacional que afecta a la especificidad de la unión del esteroide, disminuyendo la afinidad por el estradiol, sin tener efecto sobre la afinidad de la SHBG por la DHT [73,76,78]. Esto se ha observado en la proteína cristalizada, sin embargo, en la SHBG humana circulante, podrían no existir estos efectos del Zn^{2+} sobre la afinidad de la SHBG por el estradiol, ya que la mayoría del Zn^{2+} se encuentra unido a albúmina [70].

1.3.5 Glicosilación

Como ya se mencionó, la estructura proteica de la SHBG se modifica transcripcionalmente sufriendo glicosilación. La SHBG presenta un sitio de O-glicosilación, en la Thr7 y dos sitios de N-glicosilación en las posiciones Asn351 y Asn367 del dominio C-terminal [45,68]. Al sitio de O-glicosilación se une el disacárido Gal-GalNAc, que puede unir un grupo sialil en uno o los dos monosacáridos. En cuanto a los sitios de N-glicosilación, existe variedad en las cadenas de carbohidratos que se unen.

La glicosilación de la SHBG es responsable del mantenimiento de su estructura proteica y la protección del polipéptido frente a proteasas, aumentando su vida media en plasma [80]. Puede también tener influencia sobre su actividad biológica, modificando su tasa de aclaramiento y sus posibles interacciones con otras macromoléculas [80,81]. La integridad de las cadenas de carbohidratos unidas a la SHBG es importante también para la interacción del complejo SHBG-esteroide con las membranas plasmáticas de las células diana de los esteroides [81]. Específicamente, se encontró que la O-glicosilación era esencial para la unión al receptor de la SHBG en la línea celular “Michigan Cancer Foundation-7” MCF-7 [82].

Existen diferencias en la glicosilación de los monómeros, lo que da lugar a subunidades de 52 kDa y 48 kDa, por diferencias en la utilización de oligosacáridos en las posiciones Asn351 y Asn 367 [45,68,74]. En el plasma, la cantidad de las subunidades de 52 y 48 kDa está en relación 10:1 [74].

1.3.6 Homología con otras proteínas

Aunque los dos dominios N y C terminal que componen cada monómero de la SHBG muestran poca similitud en su secuencia, son muy semejantes a otros dominios “G-like” y constituyen una unidad llamada “SHBG-like domain” [41]. Las funciones asociadas a estos dominios incluyen la señalización celular, adhesión, diferenciación y migración. Este tipo de dominios está presente, entre otros, en la cadena α -laminina y en los ligandos del receptor Tyro-3 de la familia de las protein-quinasas, como GAS6 y la proteína S, mediando en ambas proteínas su función biológica [83,84] (Figura 13). Además, este tipo de dominios se encuentran también en la neurexina, en las proteínas Slit y Crumb de *Drosophila*, implicadas en su desarrollo y en proteína supresora de tumores Fat [85,86].

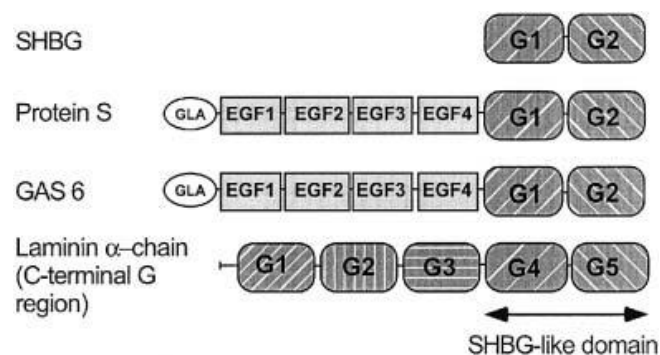


Figura 13. Dominios conservados entre la SHBG y otras proteínas. Extraída de Grishkovskaya y col., 2000 [41].

1.4 PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON LA SHBG

Además de controlar la disponibilidad de esteroides en plasma y su acceso a los tejidos, hay evidencias de que la SHBG también forma parte de un sistema de señalización de esteroides a nivel de la membrana plasmática de sus tejidos diana [38,87]. Se han encontrado sitios de unión de alta afinidad para la SHBG en la membrana plasmática de células del endometrio [88], células prostáticas [89], en la placenta humana [90], en las células cancerosas de mama MCF-7 [91], en hígado [92] y epidídimo [93]. Se ha especulado con la posibilidad de que la SHBG se internalice en las células para liberar los esteroides sexuales, aunque después de años de debate aun no se ha podido confirmar. Al detectarse mediante inmunohistoquímica la presencia de SHBG en diversos tejidos y células en humanos, se dio lugar a diferentes especulaciones e hipótesis acerca del modo en el que la SHBG ha llegado a esas células y tejidos [87].

La unión de SHBG a las membranas plasmáticas de estos tejidos se produce a través de un receptor putativo (R SHBG), que aun no se conoce. En la próstata, se ha encontrado que su sitio de unión es de 167 kDa mientras que en la mama su tamaño es de 174 kDa. Este receptor aun no ha sido identificado ni caracterizado, sin embargo, se conocen algunos aspectos de su funcionamiento y se ha definido bien la bioquímica de esta unión [94,95].

En los tejidos que responden a hormonas sexuales, se ha observado que para que tenga lugar la unión de SHBG a su receptor el esteroide no debe estar unido a la SHBG [94]. Es tras la interacción de la SHBG con el receptor cuando el ligando sexual ocupa el sitio de unión, provocando la disociación del complejo con el receptor y liberando la SHBG y el esteroide [38]. Ésto inicia la activación de una vía de señalización intracelular, aumentándose los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) en varios tejidos como la próstata cancerosa y la hiperplasia benigna de próstata, el tejido mamario y la placenta [96,97] (Figura 14). Los melanocitos constituyen una excepción al aumento de AMPC, ya que en su caso, la unión de SHBG a su receptor da lugar a una reducción en los niveles de AMPC [98].

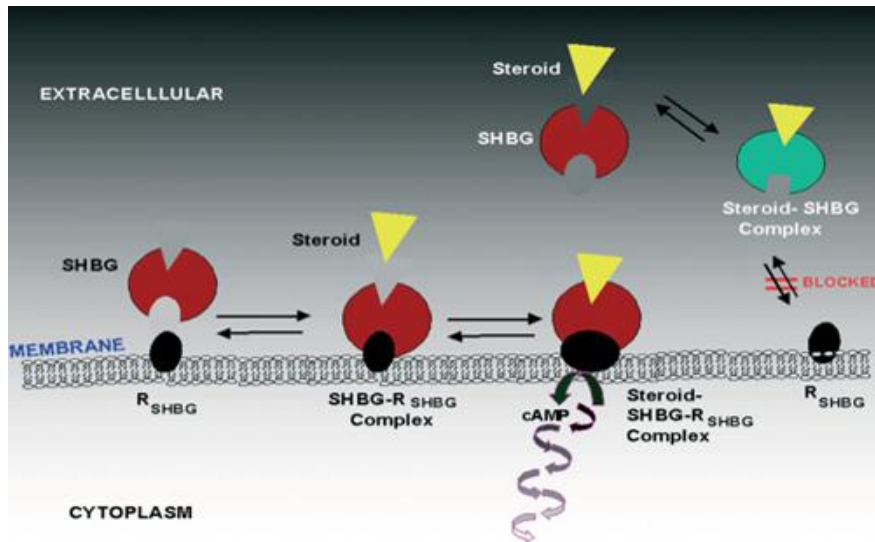


Figura 14. Modelo de unión de la SHBG a su receptor y sistema de señalización de la SHBG dependiente de AMPc. Extraído del artículo de Kahn y col., 2002 [38].

Por el tipo de respuesta intracelular generada, se ha propuesto que el receptor de la SHBG es un receptor acoplado a proteínas G, que activa la adenilciclase produciendo un aumento en AMPc [99]. En respuesta a esto se cree que se produce activación de la proteína-quinasa A (PKA) y en células de cáncer de próstata da lugar a un aumento en el antígeno específico de próstata (PSA) [100], mientras que en células de cáncer de mama, por el contrario, ocurre una disminución en su proliferación [101].

-Megalina

En diferentes estudios se ha observado, en primer lugar, que la megalina se expresa en tejidos que responden a esteroides, y en particular en los órganos reproductivos [102]; en segundo lugar, que el modelo de ratón deficiente en megalina muestra insensibilidad a los esteroides sexuales [22] y en tercer lugar, en experimentos en cultivos celulares se ha mostrado que la megalina actúa como receptor endocítico de SHBG humana y murina [22,103,104]. A partir de estos estudios se ha propuesto la megalina como componente importante en la captación de esteroides sexuales en los órganos reproductivos. A través de ella se internalizarían los esteroides sexuales en sus tejidos diana unidos a la SHBG. Sin embargo, ésta no es un receptor acoplado a proteínas G, sino que pertenece a la familia de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y no está asociada con vías de señalización e interacciones típicas de los receptores acoplados a proteínas G, como lo está el r SHBG.

-Kalikreinas

Por estudios de doble híbrido, se ha observado que la SHBG interacciona con KLK4 y KLK14 (kallikrein-related peptidases), expresadas en muchos tejidos en los que se expresa la SHBG, como las células cancerosas de próstata. Se ha propuesto que las KLKs podrían tener un papel proteolítico en la liberación del esteroide por la SHBG, que parece regular positivamente la biodisponibilidad de los esteroides dando lugar *in vitro* a un aumento de la captación de DHT por parte de estas células cancerosas de próstata [103,104].

-Fibulinas

Mediante doble híbrido se ha visto también la interacción de la SHBG con fibulina 1 y 2, proteínas de la matriz extracelular, en el útero de ratones transgénicos para la SHBG en fase proestrus [105]. Las interacciones se producen entre los dominios C-terminal de las fibulinas y N-terminal de la SHBG y son muy específicas y dependientes de esteroides, especialmente de estradiol. El estradiol promovería el paso de la SHBG del torrente circulatorio al estroma del endometrio, a través de las fibulinas, que regularían así la biodisponibilidad del esteroide a nivel local de tejido [105].

Además de estas tres proteínas, se ha encontrado co-localización de SHBG con el receptor de la oxitocina (OTR), p21 y caveolina-1 en miometrio humano normal y leiomioma uterino, proponiéndose que la co-expresión de OTR y caveolina-1 podría producirse a través de la SHBG [106].

1.5 VARIACIÓN EN LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE SHBG DURANTE LA VIDA

1.5.1 Etapa fetal

La producción hepática de SHBG durante la etapa fetal parece tener gran relevancia, ya que es la única etapa en la que ratas y ratones la expresan en el hígado [30]. En ratas, el comienzo de la expresión de SHBG en el hígado y su secreción a la sangre coincide con la aparición del receptor de la hormona luteinizante (LH) y de las enzimas encargadas de la biosíntesis de testosterona en el testículo [107]. También en conejos la producción máxima de testosterona coincide con el comienzo de la expresión de SHBG [108]- Aparte, en fetos masculinos humanos, aunque el tiempo de masculinización se da en una etapa más temprana, los niveles de SHBG durante el periodo gestacional de masculinización se correlacionan de forma positiva con los niveles de testosterona [109].

El papel de la SHBG fetal circulante no está totalmente definido, aunque en los fetos femeninos podría estar relacionado con su protección frente a la exposición a andrógenos en el útero y en los fetos masculinos podría regular la acción de los andrógenos en la diferenciación sexual [50].

Durante la etapa tardía del embarazo, los niveles de SHBG plasmática incrementan tanto en humanos [110] como en conejos [111] de 5 a 10 veces, sin embargo en otras especies como ovejas no ocurre este aumento [112]. Esta diferencia entre especies podría depender de la magnitud de la producción de estrógenos, ya que se ha propuesto que el aumento en los niveles de SHBG en esta etapa del embarazo podría ocurrir para proteger al feto de los esteroides de la madre o bien para proteger a la propia madre de los esteroides sexuales que se originan en el feto, especialmente los andrógenos [50].

1.5.2 Tras el nacimiento

A partir del nacimiento, como ya se ha mencionado en un apartado anterior, los roedores no expresan SHBG en el hígado, por tanto, no tienen SHBG en la circulación sistémica. En humanos, los niveles de SHBG varían durante las diferentes etapas de la vida, siendo generalmente mayores en el sexo femenino que en el masculino y siendo modulados por diversos factores que se tratarán posteriormente.

En neonatos, los niveles de SHBG en la sangre del cordón umbilical son 10 veces más bajos que los existentes en la sangre materna y durante la infancia estos niveles aumentan hasta aproximadamente 100 nM, lo cual es consecuencia de la maduración en la producción y acciones de las hormonas tiroideas [113] y ayuda a restringir las acciones prematuras de los esteroides sexuales derivados del metabolismo de andrógenos adrenales [50].

A la llegada de la pubertad, los niveles de SHBG disminuyen en ambos sexos, aproximadamente a la mitad en niñas y a una cuarta parte en niños [110,114], diferencia que puede ser debida a una exposición diferente a andrógenos y cambios en el estado metabólico [115,116], y que es causa de un aumento en los niveles de andrógenos y estrógenos libres en sangre, necesario para la maduración del eje hipotálamo-pituitario-gonadal [117].

Durante la vida adulta, los niveles normales de SHBG se encuentran en el rango de 20-60 nM en hombres, mientras que en mujeres, varía entre 40-120 nM si son premenopáusicas y disminuyen tras la menopausia, situándose en el rango entre 28-112 nM. En mujeres embarazadas, los niveles de SHBG aumentan llegando a ser de 247 a 668 nM [110,118,119], lo cual se ha atribuido a una

inducción dependiente de estrógenos, que también se observa en mujeres tratadas con estrógenos sintéticos [117],[110,120].

Edad/sexo	Rango en los niveles de SHBG (nmol/L)
Edad 1-23 meses	60-252
Prepuberal (1-8 años)	72-220
Mujer puberal	36-125
Hombre puberal	16-100
Mujer adulta, premenopáusica	40-120
Mujer adulta, postmenopáusica	28-112
Hombre adulto	20-60

Tabla 2. Rango de referencia de los niveles de SHBG. Datos extraídos de Hammond GL, 2011 [50].

El hecho de que las mujeres tengan más SHBG que los hombres repercute en la ocupación de los sitios de unión a esteroide de la SHBG. En las mujeres, tan sólo el 18% aproximadamente de los sitios de unión a esteroide de la SHBG están ocupados por esteroides endógenos, mientras que en hombres la ocupación es en torno al 56%. Los sitios sin ocupar podrían estar uniéndose a otros ligandos, como xenobióticos [50].

El índice de masa corporal, a partir de ahora IMC, es el principal determinante de los niveles de SHBG en sangre en personas adultas. Las personas con peso normal o delgadas presentan niveles elevados de SHBG en plasma, mientras que estos niveles son bajos en personas con sobrepeso u obesidad [121-123]. Sin embargo, entre los adultos con peso normal los niveles de SHBG pueden variar, debido por una parte al estado metabólico y endocrino [124] y por otra parte a factores genéticos en las diferentes actividades de los factores de transcripción que modulan la producción de SHBG [50,125] y a la existencia de polimorfismos tanto en el gen como en el promotor de la SHBG [126,127]. Los estudios realizados para estudiar la regulación de la SHBG serán tratados en un apartado posterior.

Existen muchas situaciones asociadas a diferentes enfermedades en las que los niveles de SHBG están por debajo o por encima del rango considerado normal.

1.6 NIVELES PLASMÁTICOS DE SHBG Y ENFERMEDAD HUMANA

Las medidas de SHBG se utilizan en clínica para determinar la cantidad de estradiol y testosterona libre [128]. Los niveles plasmáticos de SHBG están alterados en enfermedades como la obesidad [122], la anorexia nerviosa [129] o desórdenes tiroideos [130].

1.6.1 Obesidad y comorbilidades asociadas

Como ya hemos mencionado, tanto hombres como mujeres obesos de todas las edades presentan niveles bajos de SHBG en plasma [131,132]. Se ha observado que con la consecución de programas de pérdidas de peso por un lado [133] y tras someterse a cirugía bariátrica [134], pacientes con obesidad mórbida han experimentado un incremento en sus niveles de SHBG en concordancia con la disminución en su peso [133,134]. Las personas que padecen anorexia nerviosa, por el contrario, presentan niveles altos de SHBG [129].

Niveles bajos de SHBG constituyen un biomarcador de síndrome metabólico y también de resistencia a la insulina. Además predicen la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y riesgo cardiovascular [135-139]. Además, los niveles de SHBG suelen correlacionarse de forma negativa con el HOMA (homeostasis model assesment) [140].

En el caso de la DMT2, existen varios estudios epidemiológicos en los que se ha demostrado la existencia de niveles bajos de SHBG en los pacientes diabéticos tipo 2 [136,141-143]. En el estudio más reciente, el estudio SHIP, en el que se incluyeron 2077 mujeres diabéticas y no diabéticas durante cinco años, se observó que los niveles de SHBG se asociaban inversamente de forma independiente con el síndrome metabólico y la DMT2, lo que sugiere que bajos niveles de SHBG constituyen un marcador del riesgo cardiometabólico, especialmente entre mujeres postmenopáusicas [136]. Además, se han encontrado polimorfismos en el gen de la SHBG, que serán tratados más adelante, que aumentan el riesgo de padecer DMT2 [144].

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado también que los niveles bajos de SHBG son un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) [145,146], sin embargo aun no se conoce el papel de la SHBG en su etiopatogénesis.

En personas con ciertos problemas reproductivos también se encuentran niveles bajos de SHBG. En varones obesos, se produce una disminución de los andrógenos y de SHBG, mientras que aumentan los niveles de estrógenos [147]. Por su parte, las mujeres que padecen estados hiperandrogénicos, como ocurre en el caso del síndrome de ovario poliquístico (PCOS) o hirsutismo, presentan también niveles bajos de SHBG [148].

Uno de los puntos en común entre estas patologías es que constituyen un estado crónico de inflamación de bajo grado. La respuesta inflamatoria que se produce juega un papel crítico en el desarrollo de la obesidad y de sus enfermedades relacionadas. Esta inflamación crónica sería responsable de la disminución de SHBG en los pacientes que sufren estas patologías, lo que a su vez aumenta el riesgo de sufrir ECV (Figura 15).

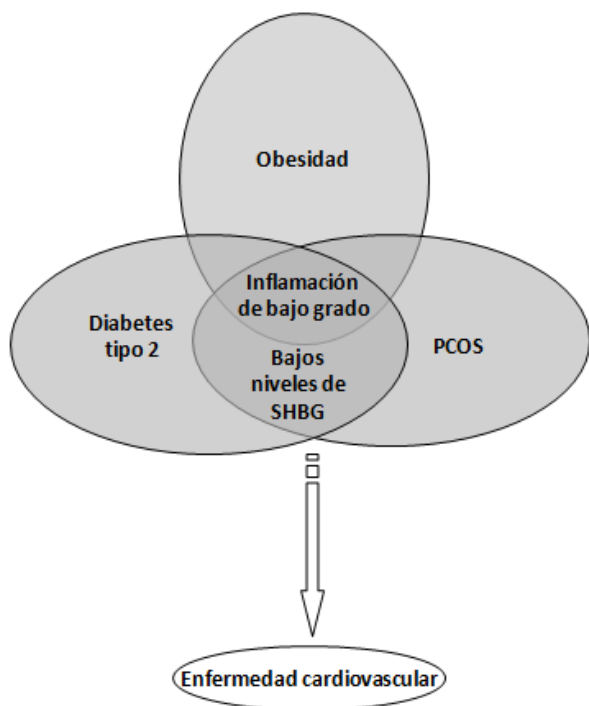


Figura 15. Diagrama en el que se muestran enfermedades de bajo grado inflamatorio en las que se encuentran niveles bajos de SHBG, que propician el desarrollo de EC.

1.6.2 Enfermedades tiroideas

Los niveles plasmáticos de SHBG también se encuentran alterados en personas que padecen enfermedades tiroideas. En el caso de las personas con hipertiroidismo, los niveles de SHBG están elevados [110,149,150]. Por su parte, las personas hipotiroideas presentan niveles bajos de SHBG [110], que aumentan al ser tratados con la hormona triyodotironina (T3) [130,151]. En las personas que sufren resistencia a hormonas tiroideas de carácter familiar, sin embargo, los niveles de SHBG no están alterados, a pesar de los elevados niveles de hormonas tiroideas circulantes en el torrente sanguíneo [130]. Esto es debido probablemente a defectos en la acción de hormonas tiroideas en el hígado, por lo que las medidas de SHBG plasmática se pueden usar en la clínica para evaluar la sensibilidad de este órgano a hormonas tiroideas [150].

1.6.3 Esteatosis hepática no alcohólica

Niveles bajos de SHBG se han encontrado asociados a la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD, siglas en inglés), sin embargo es objeto de debate si los bajos niveles de SHBG son causa o efecto del desarrollo de esteatosis hepática [152]. Los niveles plasmáticos de SHBG están relacionados inversamente con la acumulación de grasa hepática [132,153]. Se ha observado que además de la edad y el sexo, la grasa acumulada en el hígado constituye un indicador independiente de los niveles plasmáticos de SHBG, lo cual no ocurre con la grasa visceral o total [131,132]. De hecho, durante una intervención en el estilo de vida de pacientes con NAFLD y controles, se encontró que el incremento en los niveles plasmáticos de SHBG estaba más asociado a una disminución en la grasa hepática que a una disminución en la grasa visceral o total [131]. Niveles bajos de SHBG también se han visto asociados a la presencia de NAFLD en pacientes con DMT2 [154]. En otro estudio en mujeres que presentaban PCOS y NAFLD se observaron niveles más bajos de SHBG en estas mujeres que en aquellas con PCOS pero sin NAFLD [155].

1.7 REGULACIÓN DE LA SHBG

Los niveles plasmáticos de SHBG están influenciados por diferentes factores genéticos, metabólicos, nutricionales y hormonales [124]. Mediante estudios en humanos, el desarrollo del ratón transgénico para la SHBG y con las células de hepatocarcinoma humano HepG2, como línea modelo de célula hepática que expresa SHBG humana y la secreta al medio, se ha estudiado la regulación de la SHBG y se han identificado factores que regulan la expresión y los niveles circulantes de esta globulina.

1.7.1 Polimorfismos

Mediante estudios familiares se ha demostrado que la concentración de SHBG es hereditaria en aproximadamente un 50%, lo que sugiere que la concentración de SHBG está bajo un importante control genético [124].

Los niveles de SHBG pueden variar en función de la existencia de polimorfismos tanto en el gen como en el promotor de la SHBG.

1.7.1.1 Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)

Se han encontrado y caracterizado varios SNPs en la región codificante del gen de la SHBG, que dan lugar a un defecto o exceso en la producción y función de la SHBG [127] (Figura 16). El primero en identificarse fue el **SNP rs6259**, en el exón 8 del gen, que consiste en una mutación puntual GAC a AAC en el codón 327, dando lugar a la sustitución de Asp por Asn (D327N) en la secuencia polipeptídica, produciéndose un sitio más de N-glicosilación en el dominio C-terminal [156], lo que retarda la eliminación plasmática de la SHBG. Los individuos con este polimorfismo, por tanto, tienen niveles plasmáticos más elevados de SHBG, de esteroides sexuales [80] y presentan una asociación negativa con el riesgo de sufrir cáncer de mama [157] y cáncer de endometrio en mujeres postmenopáusicas [158].

El polimorfismo **rs6258**, causado por una mutación puntual CCG-CTG en el exón 4 del gen de la SHBG, resulta en una sustitución P156L en la proteína y da lugar a una glicosilación anormal y secreción deficiente de SHBG, reduciendo su afinidad en la unión a testosterona y produciendo una disminución de los niveles plasmáticos de este esteroide [159]. Este polimorfismo se ha encontrado en el 2% de los hombres Europeos y está asociado con una disminución en los niveles de testosterona [159].

El polimorfismo **rs12150660** se localiza 11.5 kb *upstream* del sitio de inicio de transcripción del gen de la SHBG y también está asociado con una disminución en los niveles de SHBG y de testosterona [159].

Otro polimorfismo asociado a una variación en los niveles de SHBG es el C/T **rs6257** [160], localizado en el intrón 1. Este polimorfismo se ha propuesto como un factor de susceptibilidad para el cáncer de mama [161].

En el caso del polimorfismo **rs1799941**, consiste en un cambio G-A en la región 5' no traducida (5'-UTR) localizado en la secuencia del promotor proximal de la SHBG, muy cerca del sitio de inicio de la transcripción. En caucásicos, la frecuencia de este polimorfismo está en torno al 25% [160,162] y tanto en hombres como en mujeres postmenopáusicas está relacionado con un aumento en los niveles de SHBG [160,163], una mayor densidad mineral ósea y un incremento en los niveles de andrógenos en hombres ancianos [164]. Recientemente, en niños turcos, este polimorfismo se ha asociado con mayor probabilidad de sufrir el síndrome metabólico [165].

1.7.1.2 Polimorfismo de repetición de la secuencia (TAAAA)_n en el promotor de SHBG

El polimorfismo consecuencia de la repetición de la secuencia (TAAAA)_n en una secuencia *Alu* del promotor de la SHBG está asociado también a una variación en sus niveles, relacionado con diferentes estados clínicos [51]. El número de repeticiones de esta secuencia es variable entre sujetos y de ellas depende la actividad transcripcional del promotor de la SHBG y la unión de proteínas nucleares al mismo [51].

En estudios *in vitro* utilizando la línea celular HepG2, se ha observado que repeticiones de 6 veces de esta secuencia TAAAA dan lugar a un silenciamiento en la transcripción de la SHBG [51]. En voluntarios sanos, los niveles plasmáticos más bajos de SHBG correspondían a un sujeto en el que los dos alelos de SHBG contenían 6 repeticiones de esta secuencia [51]. Esta repetición (TAAAA)₆ también se traduce, según lo observado en un estudio poblacional multiétnico, en una disminución en la producción de SHBG en mujeres postmenopáusicas con respecto a las que no portan esta repetición [166].

Sin embargo, en otros estudios se ha encontrado que repeticiones de 6 veces en mujeres con hirsutismo homocigotas para la repetición ha dado lugar a niveles plasmáticos de SHBG más altos en estas mujeres comparadas con pacientes homocigotos para repeticiones de 9 veces [167], lo cual se ha encontrado también en hombres sanos [164,168,169].

También se ha encontrado que una repetición (TAAAA) de 8 veces en adelante da lugar a niveles más bajos de SHBG y mayor índice de andrógenos libres tanto en mujeres que padecen PCOS [170] como en mujeres sanas [171]. De hecho, este polimorfismo de alto número de repeticiones se ha propuesto como un polimorfismo de susceptibilidad para el desarrollo del PCOS [170].

Esta diferencia entre los estudios clínicos y los resultados *in vitro* puede explicarse porque en el estudio *in vitro* se utilizó DNA “desnudo”, de manera que no se consideró la presencia de estructuras superiores de cromatina sobre la actividad transcripcional del promotor, o la contribución de otras secuencias reguladoras [127].

Existe una relación entre los polimorfismos rs1799941 y la existencia de 6 repeticiones de TAAAA en la región *Alu* del promotor, que está asociado con niveles más elevados de SHBG [159]. Eriksson y col., en 2006, estudiaron también estos dos polimorfismos rs1799941 y (TAAAA)_n, concluyendo que predicen los niveles plasmáticos de SHBG, de andrógenos y de metabolitos glucurónidos de andrógenos, así como la densidad mineral ósea de la cadera en hombres [164].

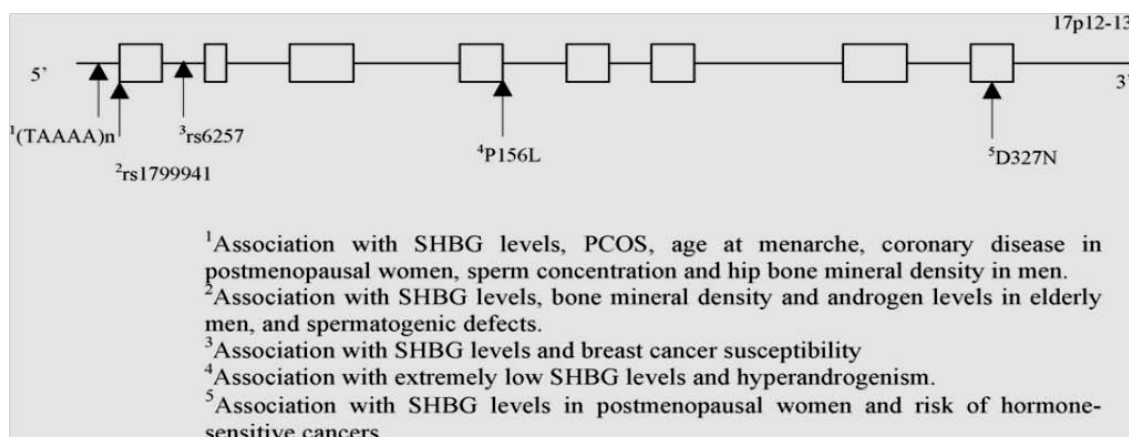


Figura 16. Resumen de los polimorfismos encontrados en el gen de la SHBG humana y su asociación con diferentes condiciones. Extraída del artículo de Xita N y col, 2010 [127].

1.7.1.3 Factores de transcripción

Los niveles de SHBG pueden variar en función de diferentes actividades de los factores de transcripción que modulan su producción [47,50]. Como se ha mencionado anteriormente, los factores de transcripción HNF-4 α , PPAR γ , USFs, ER α y COUP-TFs se unen al promotor de la SHBG, regulando su expresión [46,49]. El efecto de estos factores de transcripción sobre la producción de la SHBG se ha estudiado *in vitro* e *in vivo*, encontrándose que son reguladores clave de la SHBG.

-HNF-4 α : El HNF-4 α (NR2A1) es un factor de transcripción dependiente de ligando de la superfamilia de los receptores nucleares [172], de la cual es un miembro muy conservado [173]. Se expresa en el hígado, riñón, páncreas, intestino, colon y testículos. Se han identificado multitud de genes diana de este factor de transcripción, tanto en el hígado como en el páncreas y en el colon. En el hígado, es responsable de la expresión constitutiva de genes implicados en el metabolismo de la glucosa (como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa -PEPCK-, isoenzimas de piruvatoquinasa de hígado y glóbulos rojos -PKL/R- o glucosa-6-fosfatasa -G6Pasa-) y de fármacos y xenobióticos (como la colesterol 7 alfa-hidroxilasa -Cyp7a1-, el citocromo P450 3A4 -Cyp3a4- y el citocromo P450 2D6 -Cyp2d6-); otros de sus genes diana corresponden a apolipoproteínas [174,175]. La alteración de sus sitios de unión a promotores de diferentes genes diana puede dar lugar a enfermedades [176]. Mediante estudios con HepG2 y ratones transgénicos para la SHBG humana se ha observado que es un factor de transcripción esencial en la expresión de la SHBG en el hígado [46] y la deficiencia en sus niveles o actividad podría explicar los bajos niveles de SHBG encontrados en individuos pre-sintomáticos con DMT2 [177]. Estudios realizados por Selva y col. que trataré en un apartado posterior han demostrado que la modificación de los niveles de HNF-4 α es una vía para aumentar o disminuir los niveles tanto de expresión hepática como plasmáticos de SHBG.

-PPAR γ : El PPAR γ es un factor de transcripción que regula gran variedad de funciones en diferentes tipos celulares, incluyendo los genes que se ocupan del crecimiento y la diferenciación de los adipocitos en el tejido adiposo y de la lipogénesis en el hígado [178]. El PPAR γ pertenece a la familia de los receptores activados por los proliferadores del peroxisoma (PPAR), a la que también pertenecen PPAR α y PPAR δ , todos presentes en el hígado [179]. Estos se encargan de unir ácidos grasos y eicosanoides y además de ser los principales reguladores de la adipogénesis [180] actúan como sensores metabólicos y reguladores de la homeostasis de lípidos y glucosa en muchas líneas celulares, como las hepáticas [49]. Existen dos isoformas de PPAR γ , PPAR γ 1 y PPAR γ 2, generadas por *splicing* alternativo, que se expresan de forma muy abundante en tejido adiposo y también se expresan en otros órganos como el hígado. PPAR γ 2 contiene 30 aminoácidos adicionales al PPAR γ 1 en el extremo N-terminal [181]. Se han desarrollado agonistas de PPAR γ , como la rosiglitazona (una tiazolidinediona), que en células HepG2 disminuye ligeramente la expresión de la SHBG mientras que antagonistas como el compuesto GW9662 la incrementan [49]. En las pacientes con PCOS, cuando se les administran tiazolidinedionas, se ha observado que al contrario de lo que ocurre en HepG2, se produce un aumento en los niveles de SHBG [49,182], efecto que se atribuye a una mejora en la resistencia a la insulina y el control glicémico [47]. Por otro lado, una variante más activa del PPAR γ 2 (Pro12) disminuye en mayor medida la expresión de la SHBG en HepG2 con respecto a la secuencia común (Ala12), lo cual concuerda con el hecho de que a las pacientes con PCOS homocigotas para esta variante el tratamiento con rosiglitazona no les aumenta tanto los niveles de SHBG [49].

-USF1/2: Los factores de transcripción USF1/2 están codificados por dos genes diferentes [183], son ubicuos y forman homodímeros y heterodímeros [184]. Ambos están caracterizados por un dominio b/HLH/LZ (basic Helix-Loop-Helix/Leucine Zipper), que es el responsable de su dimerización y unión al ADN [185]. En su forma dimérica, USF1 y USF2 reconocen la secuencia CACGTG y activan la transcripción de un gran número de genes [186]. Aunque en la mayoría de los casos USF1 y USF2 actúan como activadores transcripcionales, en algunos tipos celulares reprimen la expresión de sus genes diana [187]. En el caso de la SHBG humana, se unen a la región FP4 de su promotor proximal reprimiendo la expresión de la SHBG en las células de Sertoli [35]. En el hígado, la unión de USF1 y USF2 al promotor proximal de la SHBG en el hígado da lugar a una activación de su transcripción aunque el efecto es leve, ya que los ratones transgénicos para la SHBG con el sitio de unión a USF mutado mantiene una expresión elevada de SHBG hepática [35].

-ER α : Este factor de transcripción activado por ligando pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares y su función principal es mediar las acciones de los estrógenos tanto en los

tejidos reproductivos, como en aquéllos no reproductivos (cerebro, tracto urogenital o huesos) [188]. Además de ser activado por estrógenos, se han descrito gran variedad de agonistas del ER α [188]. En el promotor de la SHBG, se ha descrito un sitio de unión a ER α , que funciona como activador transcripcional del gen de la SHBG [47], mediando el aumento en la producción de SHBG por estrógenos [189].

-COUP-TFs: Los factores de transcripción COUP-TFs son receptores nucleares implicados en diversos procesos biológicos como la neurogénesis, organogénesis o la homeostasis metabólica. En mamíferos se han identificado dos isoformas, COUP-TFI y COUP-TFII, con una gran similitud en su estructura y en sus patrones de expresión [190]. Los COUP-TFs dimerizan con RXR y otros receptores nucleares y suelen funcionar como represores transcripcionales uniéndose a secuencias que contienen repeticiones de AGGTCA imperfecta, directa o invertida [190]. Mediante estudios con la línea celular HepG2 y los ratones transgénicos para la SHBG se ha identificado la unión de COUP-TF al promotor del gen de la SHBG, compitiendo con el PPAR γ y el HNF-4 α por su unión al elemento de respuesta GGGTCAaGGGTCA, produciendo la represión transcripcional del gen de la SHBG [46].

1.7.2 Regulación por factores metabólicos

El hecho de que en muchas enfermedades metabólicas se encuentran niveles plasmáticos bajos de SHBG, ha dado lugar a la investigación de la regulación de la SHBG por factores presentes en estas enfermedades o característicos de las mismas.

1.7.2.1 Insulina

Para explicar por qué los pacientes obesos independientemente de la edad y el sexo presentan niveles bajos de SHBG, desde los años 80 la insulina se postuló como responsable de esta relación, asumiendo que los niveles altos de insulina que muestran estos pacientes actúan a nivel hepático contribuyendo a la disminución de la producción de SHBG [191]. Esta hipótesis fue apoyada por la relación inversa que existe entre los niveles de insulina y los niveles de SHBG en estos pacientes. Para intentar demostrar que esta relación es causal, Plymate SR y col. realizaron un estudio en HepG2 en el que se observó una disminución en los niveles de SHBG en células tratadas con insulina durante 7 días [192]. Sin embargo, las condiciones en las que se realizó este estudio no responden a las condiciones fisiológicas, ya que las células fueron cultivadas en medio libre de suero y no fueron suplementadas durante el tratamiento [47].

Pese a estas condiciones, tras este estudio se estableció de forma dogmática que la insulina ejercía una regulación negativa sobre la SHBG. Sin embargo posteriores estudios en condiciones más similares a la fisiología humana en HepG2 concluyeron que la insulina no regula la SHBG a nivel hepático [193,194]. Para explicar la disminución en los niveles de SHBG por el tratamiento con insulina llevado a cabo por Plymate y col. se propuso que la insulina no estaría regulando negativamente la SHBG, si no que la disminución en sus niveles podría deberse a una reducción en el nivel total de proteína producido por el tratamiento con insulina [195], lo que se confirmó después en otro tratamiento a HepG2 con insulina en medio libre de suero durante cinco días [193]. En cambio, cuando el tratamiento con insulina se realizó en medio con suero o suero inactivado, los niveles de expresión y de SHBG secretada al medio se incrementaron ligeramente [193]. Esto fue corroborado *in vivo*, usando los ratones transgénicos SHBG, que al ser tratados con estreptozotocina para inducirles diabetes, sus niveles de SHBG no subieron como cabría esperar si estuvieran regulados por la insulina, sino que disminuyeron. Esta disminución en los niveles de SHBG podría explicarse por el aumento en las citoquinas proinflamatorias que conlleva el tratamiento con estreptozotocina [193].

En muchos estudios en humanos, como ya se ha mencionado antes, se ha encontrado una relación inversa entre los niveles de SHBG y los de insulina. Sin embargo, esto no implica que la insulina sea un represor de la producción de SHBG. El estudio de Pascuali y col. se llevó a cabo con hombres obesos y delgados [196] y el estudio de Nestler JE y col. se centró en mujeres con PCOS [197]. En ambos estudios, se inhibe la secreción de insulina mediante diazóxido, que a su vez ejerce acción antiinflamatoria y en ellos se apoya la idea de que la insulina regula la SHBG, sin embargo no tienen en cuenta los efectos antiinflamatorios del diazóxido [198,199], como posible responsable del incremento de SHBG.

Posteriormente, se han realizado estudios que corroboran que la insulina no es reguladora de la SHBG, como el de Peter y col., en el que muestra que los niveles plasmáticos de SHBG están correlacionados de forma negativa con la glicemia en ayunas, sin embargo no se correlacionan con la insulinemia en ayunas ni con la secreción de insulina [131]. Además, en pacientes diabéticos de tipo 2, al iniciar el tratamiento con insulina, los niveles de SHBG se han visto incrementados en lugar de reducidos [194].

Por tanto, es posible que la acción de la insulina sobre la SHBG venga mediada por la acción de citoquinas proinflamatorias, que como veremos a continuación, se ha demostrado que regulan negativamente la producción de SHBG.

1.7.2.2 Citoquinas proinflamatorias

En condiciones como la obesidad, los macrófagos se infiltran en el tejido adiposo produciendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleuquina 1 beta (IL-1 β). Los niveles de estas citoquinas proinflamatorias se correlacionan con el grado de adiposidad y de resistencia a la insulina [200].

En pacientes obesos se ha encontrado una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de SHBG y los niveles del receptor 1 de TNF α [194]. Aparte de la obesidad, en otras enfermedades en las que la inflamación crónica está presente como son la artritis reumatoide o la osteoartritis, y que se caracterizan por altos niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias como el TNF α o la IL-1 β [201,202], se encuentran bajos niveles plasmáticos de SHBG [203,204]. En otros estudios se ha visto que el bloqueo de la activación del TNF α en enfermedades como la artritis reumatoide [205] o la artritis psoriática [206] da lugar a un aumento en los niveles plasmáticos de SHBG.

En los últimos años se ha estudiado el efecto del TNF α y la IL-1 β *in vitro* e *in vivo* para establecer los mecanismos moleculares por los que disminuyen la producción de SHBG.

-TNF α

En el caso del TNF α , se ha demostrado que inhibe la producción de SHBG *in vitro* en células HepG2 a través de su interacción con su receptor en los hepatocitos, desencadenando una cascada en la que se activa el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), que se une al promotor del HNF-4 α , actuando como un represor transcripcional y disminuyendo los niveles de HNF-4 α con el consiguiente silenciamiento en la transcripción del gen de la SHBG y la reducción en la producción de SHBG (Figura 17). *In vivo*, en los ratones transgénicos para la SHBG, el tratamiento con TNF α también disminuyó los niveles de SHBG a través de la regulación negativa de HNF-4 α por NF- κ B [194,207].

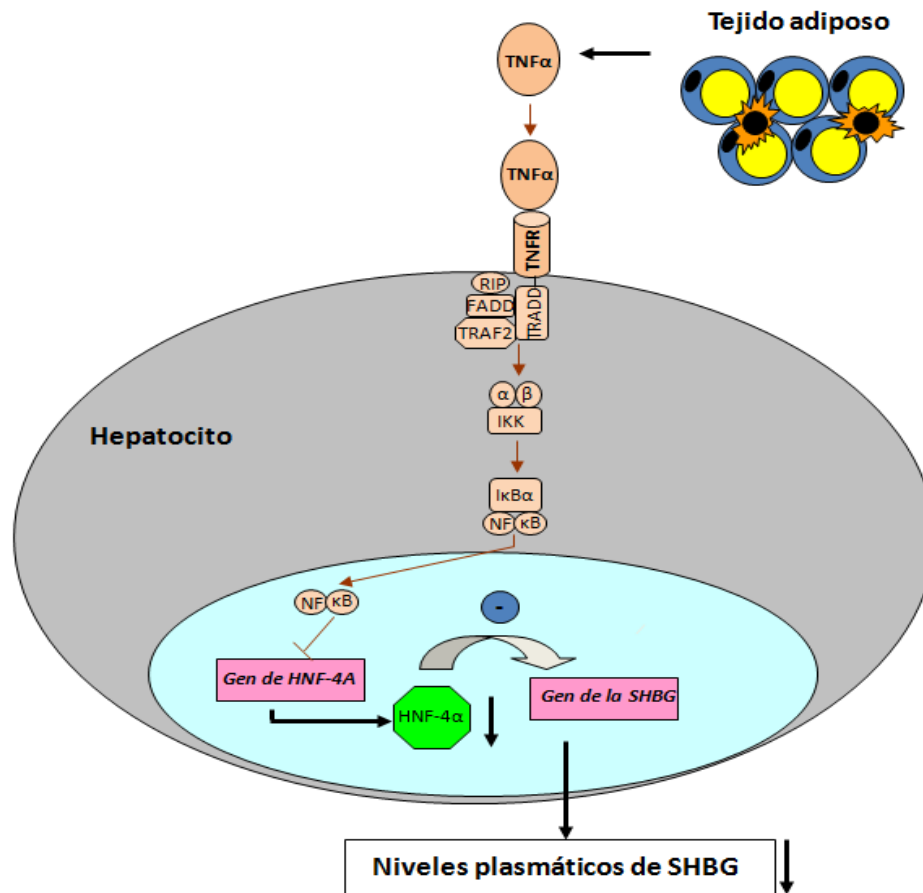


Figura 17. Esquema representativo del mecanismo por el cual el TNF α disminuye los niveles plasmáticos de SHBG a través de su acción en los hepatocitos.

-IL-1 β

La IL-1 β , por su parte, disminuye los niveles de SHBG *in vitro* en células HepG2 y en ratones transgénicos *shbg4* a través de una inhibición de los niveles de expresión y proteína del HNF-4 α . Esta citoquina proinflamatoria actúa a través de su receptor en la membrana del hepatocito, desencadenando una cascada que a través de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y de las quinasas de las proteínas quinadas activadas por mitógenos (MEK-1/2) activa c-Jun, dando lugar a la disminución de los niveles hepáticos de HNF-4 α , resultando en niveles bajos de SHBG (Figura 18). En los ratones transgénicos para la SHBG, además de reducir los niveles plasmáticos de SHBG, el tratamiento con IL-1 β dio lugar a una disminución en los niveles de testosterona total de estos ratones [208].

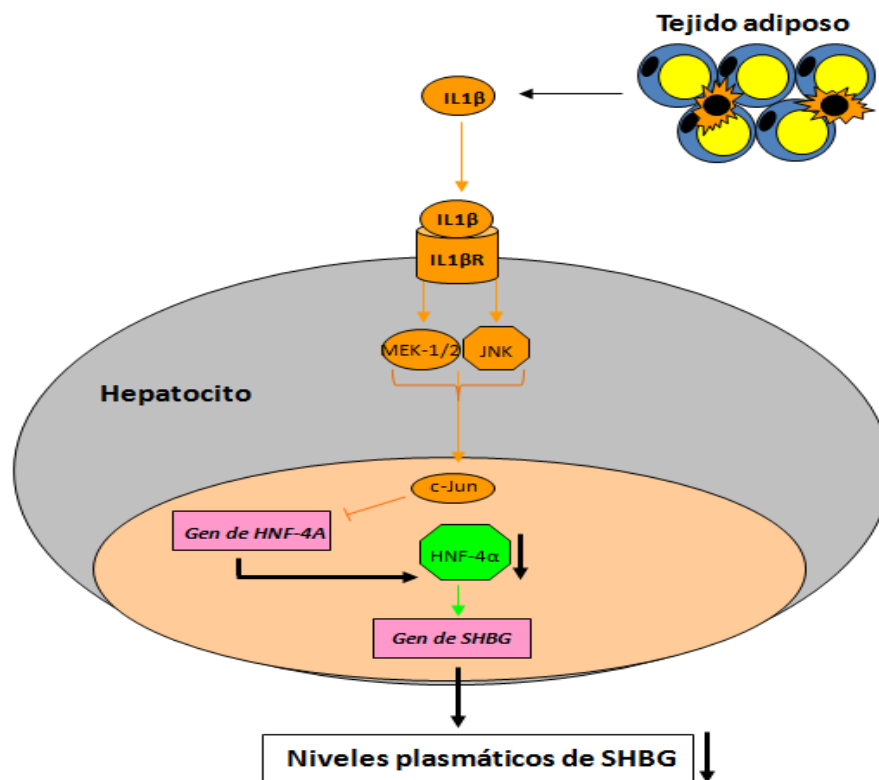


Figura 18. Mecanismo por el que la IL1 β disminuye los niveles plasmáticos de SHBG a través de su acción en los hepatocitos.

Los niveles bajos de SHBG presentes en enfermedades como la obesidad, que es considerada como un estado de bajo grado inflamatorio crónico [209], pueden por tanto explicarse por el aumento que se produce en las citoquinas proinflamatorias que regulan negativamente a través del HNF-4 α la expresión y producción de SHBG.

1.7.3 Regulación nutricional

La dieta y el estado metabólico ejercen un impacto sobre los niveles plasmáticos de SHBG. Este impacto puede ser directo por efecto de nutrientes específicos a nivel hepático o pueden ser indirectos afectando a otros tejidos, principalmente al tejido adiposo, lo que puede dar lugar al desencadenamiento de vías metabólicas que generen cambios en los niveles de glucemia o insulinemia [210].

1.7.3.1 Dieta Mediterránea

En el estudio DIANA, de Berrino y col., la dieta Mediterránea vegetariana incrementó los niveles plasmáticos de SHBG en un grupo de 52 mujeres postmenopáusicas [211]. En otro estudio

llevado a cabo por Wu y col., 2009, el patrón de alimentación propio de la dieta Mediterránea se vio asociado también de forma positiva con un aumento en los niveles de SHBG [212].

1.7.3.2 Dietas vegetarianas

Varios estudios se han dedicado a analizar la relación entre la composición de la dieta y los niveles de SHBG, aunque los resultados obtenidos son contradictorios. Mientras que en algunos estudios se ha mostrado que las dietas ricas en fibra disminuyen los niveles de SHBG [213,214], en otros estudios se ha observado que las personas vegetarianas tienen niveles plasmáticos de SHBG más elevados que las personas no vegetarianas [215,216].

1.7.3.2 Dietas ricas en proteína

En el caso de las dietas ricas en proteína, en un estudio se ha observado que dan lugar a un incremento en los niveles de SHBG [217], mientras que en otro estudio con hombres ancianos se observó un aumento en los niveles plasmáticos de SHBG con dietas bajas en proteínas [218], lo que está en concordancia con resultados previos obtenidos en conejos [219]. También se ha estudiado el efecto sobre los niveles de SHBG de la sustitución de una dieta rica en proteínas animales, compuesta por ternera, cerdo, huevos y leche por otra dieta a base de pescado blanco en mujeres postmenopáusicas. En este caso se obtuvo un incremento en los niveles de SHBG en la dieta a base del pescado blanco, lo que fue ligado a mejoras en el perfil lipídico [220].

1.7.3.3 Dietas ricas en grasas

Respecto a las dietas ricas en grasa, en el estudio de Anna H Wu y col., 2009, el patrón de dieta "Western" en un grupo de mujeres postmenopáusicas se asoció con niveles bajos de SHBG [212] y en un estudio en hombres con peso normal, el cambio de una dieta rica en grasa por una dieta baja en grasa (menos de 20 gramos de grasa/día) durante dos semanas produjo un aumento en los niveles plasmáticos de SHBG [221]. Blouin y col., en una intervención dietética de seis semanas en la que disminuyen los niveles de grasa total y grasas saturadas a consumir por mujeres premenopáusicas con sobrepeso, observan un incremento en los niveles de SHBG, con pérdida de peso [222].

1.7.3.4 Productos cafeinados

La cafeína y los productos cafeinados como el café también se han descrito como moduladores de los niveles de SHBG. Según los datos de las mujeres del estudio de "Nurses Health Study", Kotsopoulos y col., en 2009, la cafeína aumenta los niveles de SHBG en mujeres postmenopáusicas pero no en premenopáusicas [223]. También en el estudio prospectivo "Women's

Health Study", el consumo de productos cafeinados incrementó los niveles de SHBG en mujeres postmenopáusicas [224].

1.7.3.5 Carbohidratos y palmitato

La regulación de la SHBG por factores nutricionales, como los azúcares o grasas saturadas (palmitato) ha sido estudiada durante los últimos años [193]. En estos estudios, se observó que después de alimentar con dietas ricas en sacarosa, glucosa o fructosa a ratones transgénicos para la SHBG humana durante tres días, los niveles de ARNm hepático y de SHBG plasmática disminuían, siendo la reducción más efectiva cuando los ratones eran alimentados con fructosa [193]. Esto se corroboró *in vitro*, utilizando células HepG2, en las que los tratamientos con glucosa o fructosa durante cinco días dieron lugar a una gran disminución en los niveles de expresión y de SHBG secretada al medio [193]. En la regulación de la SHBG por estos monosacáridos está implicada la competición entre el HNF-4 α y el COUP-TF por su sitio de unión al promotor de la SHBG. Cuando las células no son tratadas, el sitio de unión del promotor a estos factores de transcripción está preferentemente ocupado por HNF-4 α mientras que el tratamiento con estos monosacáridos reduce los niveles de HNF-4 α , lo que permite la unión al FP1 de COUP-TF, con la consiguiente represión de la transcripción del gen de la SHBG [193].

En cuanto al ácido graso palmitato, el tratamiento durante tres días a células HepG2 resultó también en una reducción en los niveles de SHBG, acompañada de una disminución de los niveles de HNF-4 α , que estaría sufriendo una regulación negativa, con la consecuente represión de la transcripción de la SHBG [193].

1.7.4 Regulación hormonal

1.7.4.1 Esteroides sexuales

La diferencia en los niveles de SHBG entre sexos, mayores en mujeres que en hombres, ha llevado a proponer que la producción de SHBG puede estar estimulada por estrógenos y reprimida por andrógenos. Existen datos clínicos que apoyan estas hipótesis, como el hecho de que, como ya mencionamos en un apartado anterior, el tratamiento con anticonceptivos orales y los tratamientos sustitutivos para la menopausia, en los que se utiliza etinilestradiol, aumentan los niveles de SHBG [225-227]. Además, en un estudio de Odland y col., en 1982, la inducción de la ovulación por la gonadotropina coriónica humana (hCG) da lugar a un incremento en los niveles de estradiol ligado a un aumento en los niveles de SHBG [228].

Sin embargo, en estudios realizados en células HepG2 se ha encontrado que los esteroides sexuales no regulan directamente la producción de SHBG, ya que los tratamientos con andrógenos y estrógenos afectaron de forma muy leve [229] o no afectaron [230] a la producción de SHBG. De hecho, no se han identificado elementos de respuesta a andrógenos en el promotor de la SHBG.

1.7.4.2 Hormonas tiroideas

Previamente se ha mencionado que los pacientes hipertiroideos presentan niveles elevados de SHBG en plasma, mientras que los hipotiroideos poseen niveles bajos de la misma. Desde los años 70 se conoce que las hormonas tiroideas ejercen influencia sobre los niveles de SHBG [110]. Además, se ha observado un aumento en los niveles de SHBG en pacientes hipotiroideos tras varios días de comenzar el tratamiento con T3 [130]. Todo esto concuerda con los experimentos de Rosner y col., 1984 y Raggatt y col., 1992, en los que el tratamiento con hormonas tiroideas durante 2-3 días aumentó los niveles de SHBG [151,230].

Selva y Hammond (2009), corroboraron estos resultados mediante un tratamiento a células HepG2 durante cinco días con las hormonas T3 y tiroxina (T4), observando un aumento en los niveles de SHBG en ambos tratamientos. Mediante experimentos en los que bloquearon la expresión del HNF-4 α mediante un ARN de interferencia (siRNA-HNF-4 α) demostraron que este efecto sobre la SHBG está mediado por HNF-4 α . En los ratones transgénicos para la SHBG humana el tratamiento con la hormona T3 también dio lugar a un aumento en los niveles plasmáticos de SHBG de estos ratones [231].

2. LA OBESIDAD Y SUS PATOLOGÍAS ASOCIADAS

2.1 DEFINICIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Una definición más completa de la obesidad podría explicarla como una enfermedad crónica multifactorial compleja caracterizada por el aumento de tejido adiposo e influenciada por factores metabólicos, fisiológicos, genéticos, moleculares, celulares, culturales y sociales [232,233].

Para diagnosticar el sobrepeso o la obesidad en los adultos, generalmente se utiliza el IMC, que se obtiene dividiendo el peso de una persona en kilogramos (kg) entre su altura en metros al cuadrado (m^2). Aunque es el parámetro más aceptado en la determinación de la obesidad, en algunos casos como en individuos con gran musculatura o personas ancianas no resulta válido [234]. De todos modos, utilizando este parámetro y según la OMS se considera que una persona con IMC hasta 25 tiene peso normal; en el rango de 25 a 30 padece sobrepeso y si tiene un IMC igual o superior a 30 se le considera obesa. En el caso de superar los $40 \text{ kg}/m^2$ se considera que padece obesidad mórbida (Tabla 3).

IMC (Kg/m^2)	Categoría
<18,50	Bajo peso
18,5-24,99	Peso normal
25,00-29,99	Sobrepeso
30,00-34,99	Obesidad (grado I)
35,00-39,99	Obesidad (grado II)
≥ 40	Obesidad (grado III)

Tabla 3. Definición del sobrepeso y la obesidad en función del IMC según la OMS.

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

Durante las últimas tres décadas, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad han aumentado gravemente, alcanzando cifras epidémicas. De hecho, constituyen el sexto factor principal de riesgo de muerte en todo el mundo, siendo causantes de en torno a 3,4 millones de defunciones. Según la OMS, en torno a un 5% de los fallecimientos anuales a nivel mundial se deben a la obesidad y si su

prevalencia continúa la trayectoria reciente, casi la mitad de la población adulta podría padecer sobrepeso u obesidad en 2030 [235].

El incremento en la prevalencia de la obesidad no es homogéneo a nivel mundial, sino que afecta en diferente proporción a los países en función de su desarrollo. Así, mientras que en los países desarrollados el incremento de la obesidad sucedido en la década de los 80 se ha atenuado en los últimos años, en los países en desarrollo, donde casi dos de cada tres personas son obesas, el incremento en la prevalencia de estos desórdenes está al alza. La prevalencia de la obesidad también depende del sexo, siendo mayor en las mujeres que en los hombres en 168 de los 169 países con datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) disponibles (Figura 19).

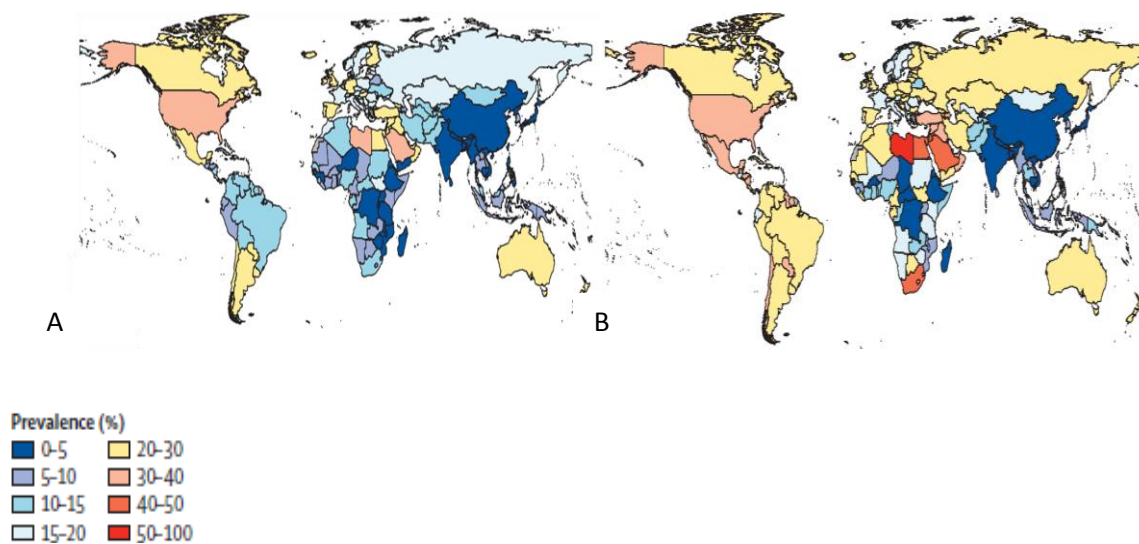


Figura 19. Prevalencia de la obesidad en hombres (A) y en mujeres (B) en 2013 en los diferentes países del mundo. Adaptada de Ng y col., 2014 [236].

2.3 ETIOPATOGENIA DE LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad compleja y multifactorial, que se desarrolla por interacción de factores genéticos, epigenéticos y ambientales [232]. Entre las causas que explican el aumento en obesidad y sobrepeso durante estas últimas décadas, se encuentra una mayor ingesta de calorías acompañada de un mayor sedentarismo, así como un cambio en la composición de la dieta y una variación en la microbiota intestinal.

En términos generales, el estado de obesidad tiene lugar cuando el consumo de energía excede continuamente a su gasto, dando lugar a un desequilibrio energético crónico [237]. Sin embargo, esto no es un concepto sencillo, ya que existe una gran red de sistemas neuroendocrinos y

metabólicos que regulan el consumo, almacenamiento y gasto energético. Entre los diversos mecanismos implicados en la etiopatogenia de la obesidad se encuentran mecanismos genéticos, mecanismos relacionados con la regulación del apetito y de la sensación de saciedad, termogénesis y disipación de energía, alteraciones estructurales y funcionales del tejido adiposo, regulación de la lipólisis, producción y eficacia biológica de la leptina alteradas, alteraciones también en la producción de citoquinas, desequilibrios nutricionales y/o metabólicos [238] (Figura 20).

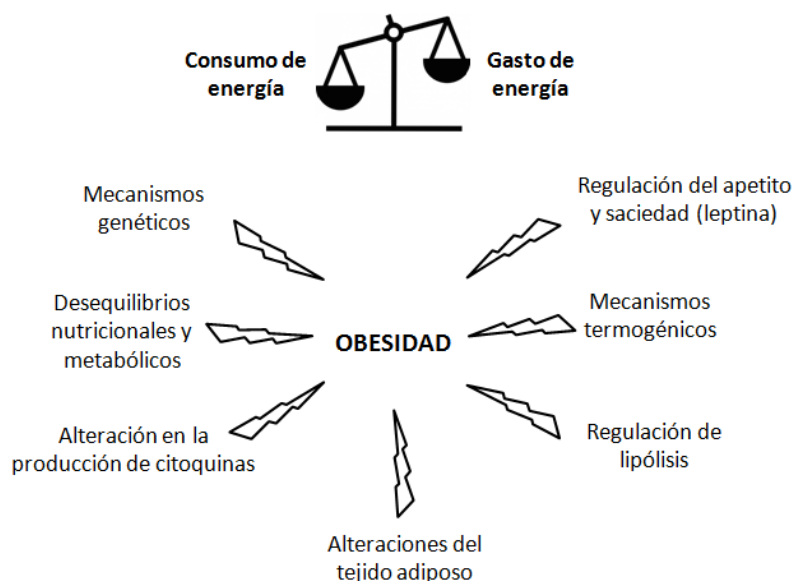


Figura 20. Mecanismos etiopatogénicos que causan el desequilibrio entre el gasto y el consumo de energía y conducen a la obesidad.

2.4 EL TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO

Uno de los órganos clave en el desarrollo de la obesidad es el tejido adiposo. Además de los adipocitos, el tejido adiposo está compuesto por otros tipos celulares que contribuyen a su crecimiento y función, como los preadipocitos, linfocitos, macrófagos, células vasculares y fibroblastos. En 1971, Björntorp estableció que el aumento de masa adiposa característica de la obesidad puede darse por uno de los siguientes factores o por confluencia de ellos: un exceso en el número de adipocitos (hiperplasia) y un mayor tamaño de los mismos (hipertrofia) [239]. En los sujetos con obesidad mórbida, una reducción de peso viene acompañada de una reducción en el tamaño del adipocito y no en el número de los mismos [240].

Aunque tradicionalmente ha sido considerado sólo como un lugar de almacenaje de lípidos, actualmente se conoce que el tejido adiposo está implicado en el control de metabolismo energético y actúa como un órgano endocrino, secretando numerosos factores a los que se les ha dado el nombre de adipoquinas [241-243]. Entre ellas, se encuentran hormonas como la leptina y adiponectina, que poseen funciones en la regulación del peso corporal; citoquinas proinflamatorias

como el TNF α , interleuquina 6 (IL-6), IL-1 β , implicadas en la función del sistema inmune; angiotensina e inhibidor del plasminógeno tipo 1, relacionados con la función vascular; estrógenos para la función reproductiva o resistina, relacionada con el desarrollo de la resistencia a insulina. Estos factores intervienen en la sensibilidad a la insulina, la homeostasis de lípidos, el control de la presión arterial, etc, y contribuyen a las patologías asociadas con la obesidad [241,244].

El desarrollo de obesidad da lugar a un cambio en la composición celular del tejido y su fenotipo, pasando de la función metabólica normal del tejido adiposo delgado a la disfunción metabólica primero ligera y después completa del tejido adiposo obeso [245]. Aparte de la hipertrofia que sufren los adipocitos debido al aumento en el contenido de triglicéridos, en el tejido adiposo obeso se produce la infiltración de un mayor número de macrófagos activados (M1) y células T [246], lo cual está ligado a un estado de inflamación sistémica y resistencia a la insulina y lleva consigo un cambio en perfil de secreción de adipoquinas del tejido adiposo [245] (Figura 21). Así, el tejido adiposo obeso da lugar a una elevada producción de citoquinas proinflamatorias mientras que reduce la secreción de citoquinas antiinflamatorias [246]. Ésto implica que la obesidad es un estado de bajo grado inflamatorio [209,246,247] y esta relación está apoyada por estudios clínicos y epidemiológicos que muestran una conexión clara entre el desarrollo de estas respuestas inflamatorias de bajo grado y la obesidad y DMT2 [245]. Además, la pérdida de peso resulta en una reducción en el número de macrófagos del tejido adiposo, así como de las citoquinas proinflamatorias secretadas [248].

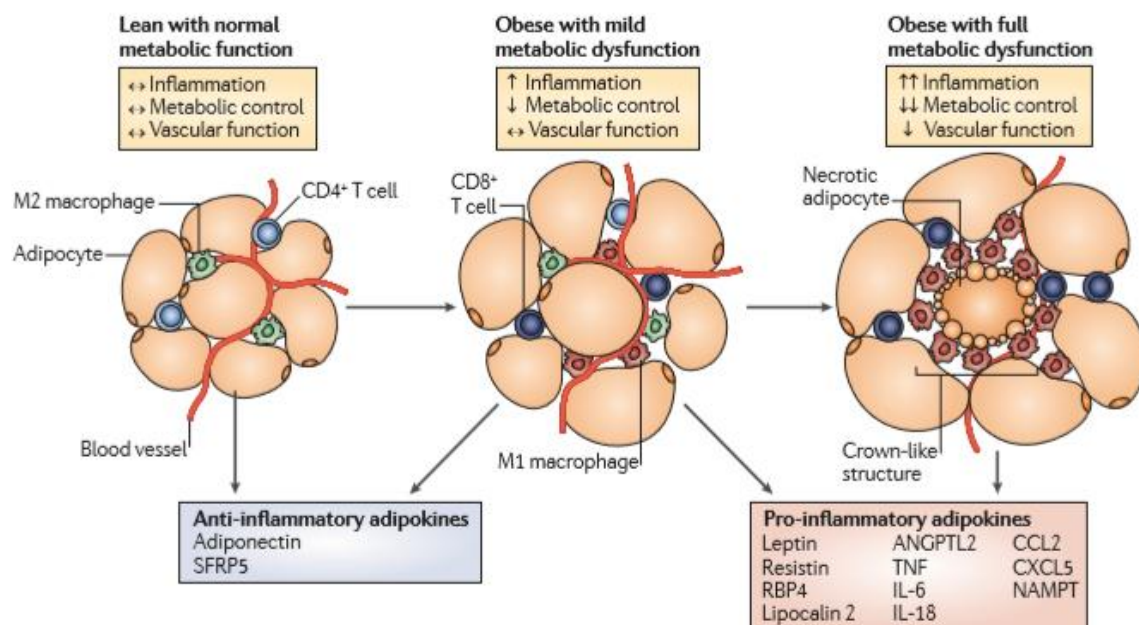


Figura 21. Representación del cambio en el perfil metabólico de los adipocitos durante el desarrollo de la obesidad. Extraída de Ouchi N y col., 2011 [245].

2.4.1 Adipoquinas proinflamatorias

El aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias propio del tejido adiposo obeso, produce el desarrollo del estado de inflamación crónica que contribuye a la disfunción metabólica. De las citoquinas proinflamatorias incrementadas en el tejido adiposo obeso, las más importantes son la leptina, IL-1 β y TNF α [245], que serán brevemente descritas a continuación.

-Leptina: La leptina es una hormona peptídica de 167 aminoácidos producida mayoritariamente por el tejido adiposo y estructuralmente homóloga a las citoquinas. Su receptor, denominado ObR, pertenece a la familia de los receptores de citoquinas. Los niveles de leptina secretados por el tejido adiposo son proporcionales a la masa del mismo y al estado nutricional, siendo mayores en individuos obesos [241] y viéndose disminuidos en situaciones de ayuno y cuando se produce pérdida de peso. La expresión y secreción de leptina está regulada positivamente por insulina, glucocorticoides, TNF α y estrógenos y negativamente por andrógenos, ácidos grasos libres, actividad β -adrenérgica, la hormona del crecimiento y agonistas PPAR [249].

La leptina juega un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos (actuando como factor saciante), el gasto energético y la adiposidad [250]. La mayoría de los efectos que ejerce la leptina son mediados a través de vías hipotalámicas, y otros mediante su acción directa en tejidos periféricos, como el músculo o las células pancreáticas [241]. Tras la ingesta de alimentos, la leptina se transporta al cerebro, uniéndose a su receptor en el hipotálamo, lo que produce la activación de JAK/STAT3, dando lugar a la supresión de péptidos orexigénicos y al aumento en la producción de péptidos anorexigénicos (Figura 22). En condiciones de ayuno, los niveles de leptina disminuyen rápidamente y conllevan cambios en el balance hormonal, induciendo sobrealimentación mediante un aumento en los niveles de péptidos orexigénicos y reduciendo los niveles de los péptidos anorexigénicos y suprimen el gasto energético [251].

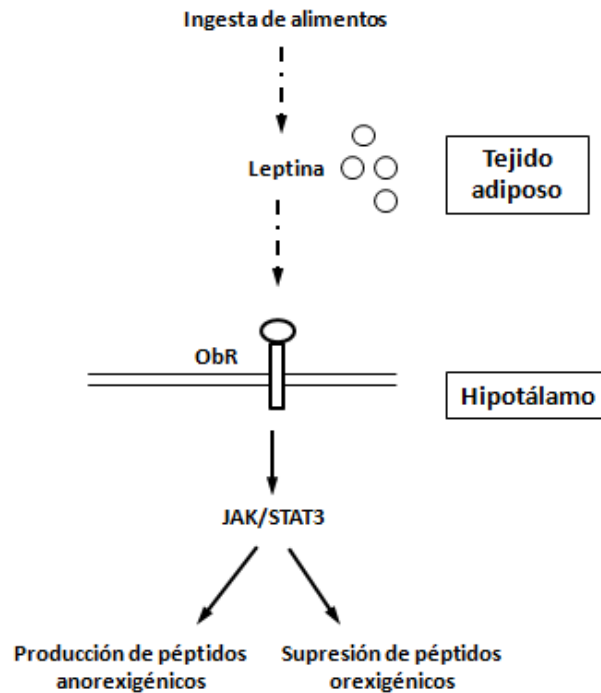


Figura 22. Representación del mecanismo de acción básico de la leptina sobre el hipotálamo.

Los animales con déficit de leptina, o que producen una hormona no funcional (*ob/ob*) o aquellos con defectos en su receptor, por tanto resistentes a la acción de la leptina (*db/db*) presentan hiperfagia, obesidad, diabetes, hipotermia e infertilidad [252].

-IL-1 β : IL-1 β es una adipoquina producida por macrófagos como precursor inactivo pro-IL1 β , y para ser activada, sufre un procesamiento proteolítico por la caspasa1, a su vez activada por los inflamasomas [253], que contribuyen a la inflamación inducida por la obesidad y a la resistencia a la insulina [254]. En el plasma de individuos obesos se encuentran niveles altos de esta citoquina, lo que predice el riesgo de sufrir DM2 [255]. Su bloqueo por el antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1RA) ha mostrado que tiene un papel principal en enfermedades autoinmunes y la falta del receptor de IL-1 (IL-1R) protege frente a la resistencia a la insulina inducida por dieta rica en grasa, así como frente a la inflamación local del tejido adiposo [256].

La activación de IL-1 β , así como la de su isoforma interleuquina 1 alfa (IL-1 α), produce un rápido incremento en la expresión de cientos de genes de tipos celulares diferentes. En el hígado, la IL-1 β circulante se une al receptor de tipo IL-1 junto con su proteína accesoria, lo cual causa la activación de dos kinasas asociadas al receptor, que activan y reclutan el factor 6 asociado al receptor de TNF- α (TRAF6) al complejo del receptor de IL-1. TRAF6, mediante eventos de fosforilación y ubiquitinación, activa dos vías diferentes, una que resulta en la activación de NF- κ B y

otra que activa c-Jun a través del sistema de señalización MAPK/JNK [257], lo que a su vez induce la expresión de genes diana de la familia IL-1 mediante mecanismos transcripcionales y postranscripcionales [258] (Figura 23).

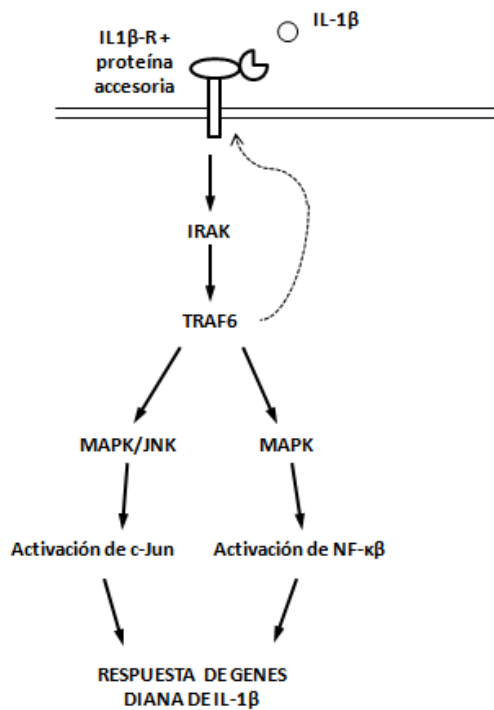


Figura 23. Representación de la vía de señalización de la IL-1 β a nivel hepático.

-*TNF α* : Esta adipocina es producida principalmente por monocitos y macrófagos y juega un papel muy importante en enfermedades inflamatorias y autoinmunes [245]. Su expresión se encuentra elevada en los tejidos adiposos de modelos de obesidad y DMT2 [259]. De hecho, el bloqueo de su vía de señalización en animales obesos mejora su sensibilidad a la insulina [260]. Altos niveles de esta adipocina se encuentran también en el tejido adiposo y plasma de pacientes obesos y correlacionan positivamente con marcadores de insulino resistencia, reduciéndose con la pérdida de peso [261].

A nivel hepático, *TNF α* interacciona con los receptores *TNF-R1* y *TNF-R2* [262]. Como estos receptores carecen de dominios kinasa catalíticos en su región intracelular, para que se lleve a cabo la transducción de la señal utilizan proteínas asociadas al receptor. Una vez producida la unión del ligando, el dominio de muerte de la proteína FADD (Fas-associated death domain) interacciona directamente con Fas, mientras que FADD se une a *TNF-R1* a través del dominio de muerte de la proteína asociada al *TNF-R1* (TRADD), lo que da lugar a la activación de la cascada de la caspasa, dando lugar a la señalización apoptótica. Por otro lado, los receptores de *TNF* se unen a los factores

asociados a los receptores TNFR1 y TNFR2 (TRAF1 y TRAF2), activando la señalización de proteínas que incluyen c-JUN/JNK y NF- κ B. La activación de NF- κ B se produce tanto por esta vía, que incluye la unión de TRAF a la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) y la activación de la quinasa inhibidora de la quinasa del factor kappa B (IKK- α) [263] como por una vía independiente de TRAF (TRIP) y resulta en la transcripción de los genes diana de NF- κ B [262] (Figura 24).

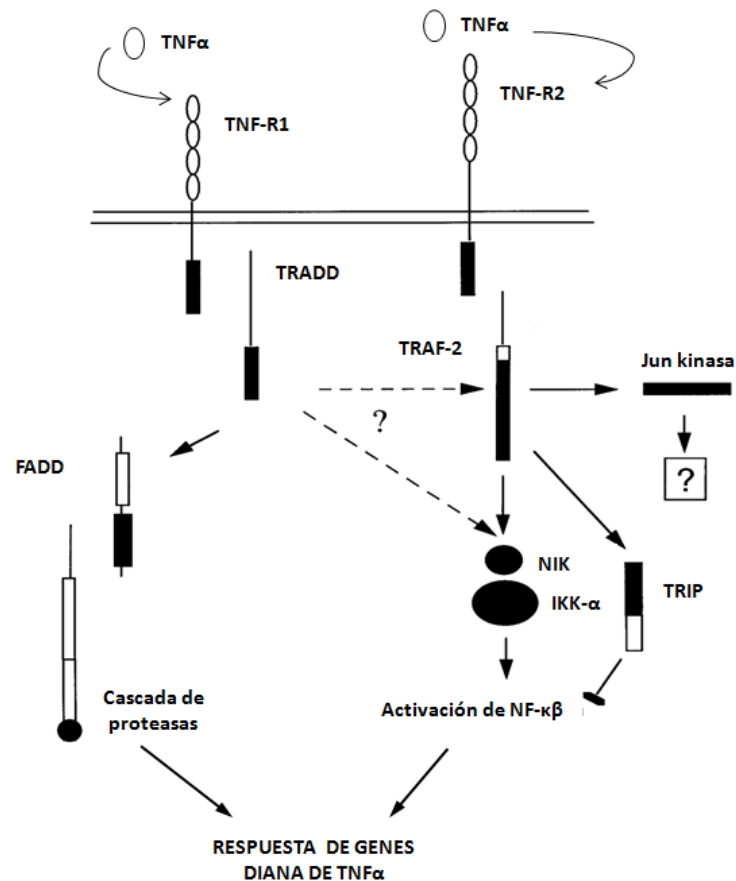


Figura 24. Representación de la vía de señalización del TNF α a nivel hepático. Adaptada de Bradham CA y col., 1998 [262]

2.4.2 Adipoquinas antiinflamatorias

Además de las citoquinas proinflamatorias, el tejido adiposo también secreta factores antiinflamatorios, de los que el más estudiado es la adiponectina [245].

2.4.2.1 Adiponectina

La adiponectina se identificó como una proteína expresada y producida por los adipocitos murinos diferenciados 3T3-L1 [264] y fue clonada por Hu y col. en 1996 [265]. En humanos, también en 1996, fue descrita por Maeda y col. como el transcrito más frecuente en el tejido adiposo en

mujeres [266] y purificada del plasma humano por Nakano y col. [267]. La adiponectina es una proteína relativamente abundante, cuya concentración en humanos se encuentra en el rango de 0,5 a 30 µg/ml y representa aproximadamente el 0,01% de la proteína plasmática total [268].

El gen de la adiponectina humana se localiza en el cromosoma 3q27 y codifica una proteína compuesta por 244 aminoácidos, con un peso molecular de 30 kDa. Su secuencia primaria contiene un péptido señal en el extremo N-terminal y un dominio globular en su región C-terminal [269].

La adiponectina es producida y secretada principalmente por el tejido adiposo blanco, y según un estudio por Viengchareun y col., en 2002, también es producida por el tejido adiposo marrón [270]. Su secreción es inducida durante la diferenciación adipocitaria, a través de la activación de PPAR γ [271,272] y está regulada por varias hormonas como la leptina, la insulina, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), prolactina y somatotrofina, así como por factores nutricionales y ambientales [273].

Se han descrito dos receptores diferentes de adiponectina que presentan especificidad tisular: el receptor de adiponectina 1 (adipoR1), expresado de forma ubicua pero más abundante en músculo esquelético y células endoteliales; el receptor de adiponectina 2 (adipoR2), que se localiza preferentemente en el hígado [274]. La afinidad del adipoR1 por la adiponectina es mayor que la del adipoR2 y ambos median una respuesta basada en la activación de la quinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) [275]. La AMPK funciona como un sensor de energía en la célula, de manera que cuando existe una cantidad celular de adenosín monofosfato (AMP) elevada con respecto al adenosín trifosfato (ATP), se activa la quinasa y da lugar a la fosforilación de proteínas diana como la ACC o coactivadores de transcripción regulados por la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), para restaurar el estado energético a través de mecanismos como el aumento en la oxidación de los ácidos grasos y transporte de glucosa [274,276] y la disminución de la lipogénesis hepática [277,278].

La adiponectina está implicada en la regulación de la acción de la insulina y el metabolismo lipídico. En numerosos estudios se ha demostrado que posee actividad insulinosensibilizante, antiinflamatoria y antiaterogénica, además de tener un papel cardioprotector, hepatoprotector y antiangiogénico [279-283].

2.4.2.2 Regulación de los niveles de adiponectina

Los niveles de adiponectina están inversamente relacionados con el tamaño del adipocito y se encuentran bajos en individuos obesos [268,284,285]. Estos niveles bajos incrementan cuando se produce pérdida de peso [286].

La expresión de la adiponectina en el tejido adiposo blanco y sus niveles en la circulación sistémica dependen de factores como la edad o el sexo, viéndose correlacionados directamente con la edad y siendo más altos en mujeres que en hombres [287]. Además, los niveles de adiponectina son elevados en condiciones de peso normal y anorexia, sensibilidad a la insulina o lipoproteínas de alta densidad (HDL) elevadas. Aumentan también con la exposición al frío, con el tratamiento con agonistas de PPAR [288], IGF-1, adrenalectomía y consumo de dieta proteica, entre otros factores [289].

La hipoadiponectinemia es un factor etiológico clave en las condiciones patológicas asociadas a la obesidad [290] como inflamación, DMT2, resistencia a la insulina, enfermedad cardiovascular, NAFLD, dislipemia o hipertensión, presentando todas ellas niveles de adiponectina reducidos [286,289,291-293]. A su vez, los niveles de adiponectina disminuyen con dietas ricas en carbohidratos, con tratamientos con glucocorticoides, agonistas β -adrenérgicos y TNF α [294-297].

Con respecto a la insulina, existen resultados conflictivos puesto que tratamientos cortos con insulina a adipocitos 3T3-L1 [264] o a adipocitos de rata [297] dio lugar a un aumento en los niveles de expresión y secreción de adiponectina mientras que un tratamiento más largo los disminuyó [295].

2.4.2.3 Efectos farmacológicos de la adiponectina

Dada la relación entre los niveles de adiponectina y estas condiciones patológicas, se ha estudiado el efecto de esta hormona sobre su desarrollo [298]. Se ha encontrado que los niveles elevados de adiponectina presentan efectos beneficiosos sobre el estado inflamatorio [299], resistencia a la insulina [300,301], en relación a la aterosclerosis [274,302-304], también sobre el desarrollo de DMT2 [274,289,305], el síndrome metabólico [290,306], así como sobre NAFLD [307-310] entre otras patologías.

2.4.2.4 Relación entre los niveles de adiponectina y SHBG

Tanto los niveles plasmáticos de adiponectina como de SHBG se encuentran bajos en pacientes obesos o en condiciones patológicas asociadas a la obesidad. Diferentes estudios epidemiológicos han correlacionado de forma positiva los niveles plasmáticos de SHBG con los niveles de adiponectina [311-314] y ambos de forma negativa con el IMC [121,123,315,316]. De hecho, la disminución de los niveles de adiponectina en pacientes obesos parece intervenir en el desarrollo de complicaciones como la esteatosis hepática no alcohólica, que a su vez se asocia con niveles bajos de SHBG.

2.5 LA OBESIDAD COMO FACTOR DE RIESGO PARA OTRAS PATOLOGÍAS

La obesidad se ha asociado de forma consistente en estudios epidemiológicos como factor de riesgo o causa común de otros desórdenes, como la DMT2, el síndrome metabólico, ECV, trastornos del aparato locomotor o algunos tipos de cánceres (endometrio, ovario y colon), así como del desarrollo de NAFLD, desórdenes pulmonares como las apneas obstructivas del sueño o desórdenes neurológicos [317] (Figura 25).

El cluster de desórdenes compuesto por la obesidad, la resistencia a la insulina y el riesgo cardiovascular se conoce como síndrome metabólico y los indicadores que lo definen son la adiposidad abdominal, dislipidemia aterogénica (altos niveles de HDL y triglicéridos), elevada presión sanguínea y elevados niveles de glucosa en sangre [318]. El vínculo etiológico entre la obesidad y este tipo de desórdenes podría residir en un estado crónico de bajo grado inflamatorio que daría lugar a situaciones como la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y el estrés oxidativo, producidas por el incremento de la producción de citoquinas y el reclutamiento de células inmunes en el ambiente extracelular que inducen una inflamación sistémica. Esta respuesta inflamatoria juega un papel crítico en el desarrollo de estas enfermedades relacionadas con la obesidad [319-321].

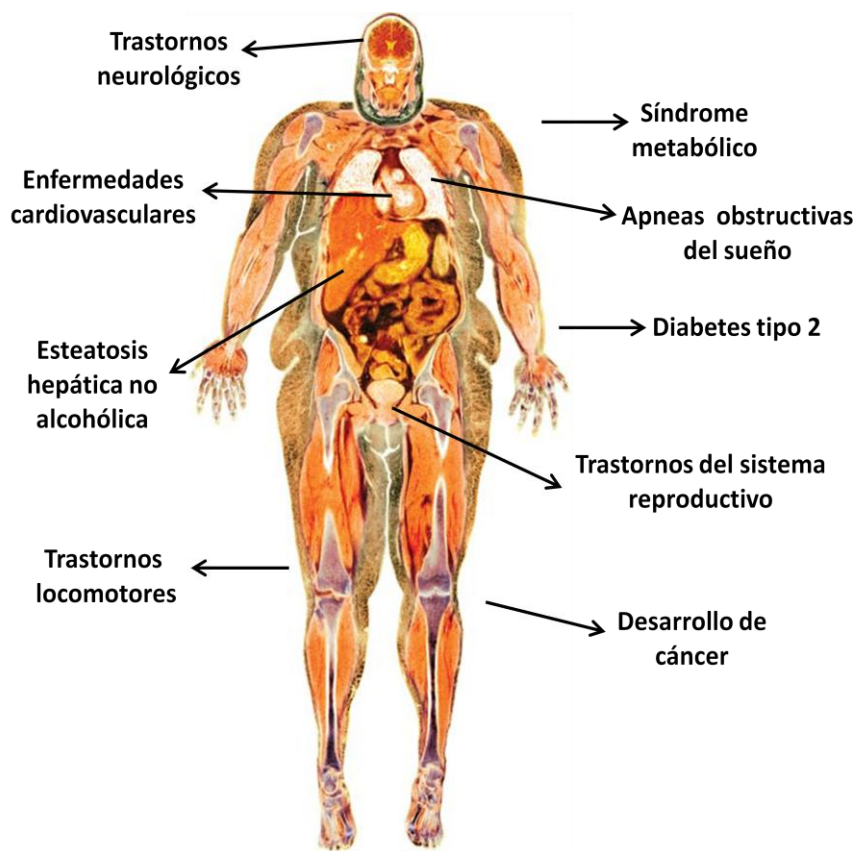


Figura 25. La obesidad como factor de riesgo para otras enfermedades.

Algunos de los trastornos relacionados y/o derivados de la obesidad serán brevemente tratados a continuación.

2.5.1 DMT2

La aparición de la DMT2 en el paciente obeso se debe fundamentalmente a la hipersecreción del tejido adiposo obeso de ácidos grasos, glicerol y citoquinas proinflamatorias, que reducen la sensibilidad a la insulina, alterando la función de las células que responden a insulina y su habilidad de responder a ella, por tanto, dando lugar a resistencia a la insulina [322]. Cuando se acompaña de una disfunción de las células β pancreáticas, no se puede contrarrestar esta resistencia a la insulina y se desarrolla DMT2 [323]. El acúmulo de grasa visceral debido a esta resistencia a la insulina conecta los dos desórdenes fisiopatológicamente. La pérdida de peso, aunque sea de forma moderada, aumenta la sensibilidad a la insulina y suele mejorar el control de la DMT2 [324].

La DMT2 viene definiéndose, junto con la obesidad, como la pandemia del siglo XXI ya que su prevalencia ha aumentado en las últimas décadas, de manera que se estima que en el 2025 afectará a 300 millones de personas (5,4% de la población mundial) [325]. La DMT2 evoluciona en paralelo con la obesidad, de hecho, alrededor de un 80% de los pacientes que la sufren son obesos. Por ello, se utiliza el término “Diabesity” (diabesidad) para referirse al origen común de ambas enfermedades [324].

2.5.2 Trastornos reproductivos

Los trastornos reproductivos incluyen desórdenes del sistema reproductivo entre los que se encuentran la disfunción sexual, anomalías congénitas o cánceres del sistema reproductivo. Estos trastornos se vinculan con la obesidad tanto en varones como en mujeres [326].

En varones, por un lado se ha observado que la oligozoospermia y la astenospermia aumentan con el IMC [327]. En ellos, el hipogonadismo se relaciona con un aumento en el tejido adiposo, que se distribuye en muchas ocasiones según el modelo femenino o ginecoide. En varones obesos, se produce una disminución de los andrógenos [147,328] mientras que aumentan los niveles de estrógenos [328], por la conversión por aromatasas de andrógenos a estrógenos en el tejido adiposo periférico [329], lo cual da lugar a la reducción en los niveles de testosterona [330] y la supresión de las gonadotropinas por el aumento en la retroalimentación negativa de estrógenos.

En las mujeres obesas, hay un aumento en la producción de andrógenos y también en la conversión periférica de andrógenos a estrógenos. La obesidad tiene efectos sobre el ciclo menstrual, dando lugar a menstruaciones irregulares, menos fertilidad [326] y está asociada con un mayor riesgo de aborto [331] y de defectos en el nacimiento [332]. Además, hasta un 80% de los casos de mujeres que padecen PCOS en Estados Unidos y en torno a un 20% en otros países son obesas [333].

En estudios de obesidad experimental se ha observado que los modelos de obesidad genética padecen infertilidad en los modelos más extremos y tienen su capacidad reproductiva empeorada en los modelos de obesidad moderada. Además, se ha observado que la castración en ratones machos [334] y ovariectomía en hembras [335, 336] da lugar a obesidad.

2.5.3 NAFLD

La esteatosis hepática no alcohólica representa un conjunto de desórdenes hepáticos que comprenden la esteatosis, esteatohepatitis y cirrosis, no debidas a ingesta excesiva de alcohol [337-339].

La NAFLD constituye una de las causas principales de la morbilidad y mortalidad relacionadas con el hígado, y la principal causa de disfunción hepática en personas no alcohólicas y sin hepatitis vírica en Europa y Norte América [340,341]. De hecho, entre un 21% y un 31% de los adultos en Estados Unidos [342,343] y entre un 2 y un 44% de la población general en Europa la padecen [344]. Su prevalencia depende en cierto modo del sexo y el grupo étnico, siendo mayor en los hombres y en la población hispánica [345,346].

Estudios poblacionales han mostrado que la NAFLD está altamente relacionada con enfermedades metabólicas como la DMT2 y la obesidad, afectando a un 50% de pacientes diabéticos y un 76% de obesos y con una incidencia de casi un 100% en pacientes diabéticos con obesidad mórbida [337,347-350]. Además, la DMT2 predice el desarrollo de NAFLD y viceversa [351]. Entre la población que no padece obesidad ni DMT2, son susceptibles de desarrollar NAFLD aquellas personas con niveles elevados de glicemia en ayunas, hiperuricemia, obesidad central, hipertensión y bajos niveles de HDL [352].

Muchos autores consideran la NAFLD como la manifestación hepática del síndrome metabólico [339,353,354], aunque existe un debate sobre si el síndrome metabólico la precede, o si por el contrario, es la NAFLD la que anticipa el desarrollo de algunos de sus componentes [355,356].

La NAFLD se caracteriza por la acumulación de triglicéridos en el hígado, la cual resulta cuando el flujo de lípidos hacia este órgano y la lipogénesis *de novo* exceden su uso y exportación [357]. La lipogénesis *de novo* se define como la síntesis de ácidos grasos de una fuente no lipídica [358], como la sacarosa o la fructosa, que consumidas en exceso dan lugar a la formación de grasas [359]. Por otro lado, el elevado consumo de grasas da lugar a lipotoxicidad por la gran producción de ceramidas que se generan del palmitato [359].

Aunque no se conoce exactamente su patogénesis, el desequilibrio presente en la NAFLD puede estar producido por la alteración de factores locales y sistémicos que controlan el balance lipídico en el hígado, como la resistencia a la insulina [337]. Ésta provoca hiperinsulinemia, que da lugar a un aumento en los niveles de ácidos grasos libres en el suero procedentes del tejido adiposo, que al ser captados por el hígado, provocan la producción de triglicéridos y su acumulación, dando lugar así a un hígado esteatótico. Además promueve el aumento de lipogénesis a través de factores de transcripción clave, como son el PPAR γ y la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP1) [337,359,360], que controlan los niveles de enzimas lipogénicas tales como la ACC, la ácido graso sintasa (FAS) o la ATP-citrato liasa (ACLY). El estado esteatótico del hígado también está favorecido por la reducción de las proteínas microsomales transportadoras de triglicéridos (MTP) y de la apolipoproteína B, que produce una disminución de la exportación de lípidos del hígado, favoreciendo la acumulación en el mismo [337](Figura 26).

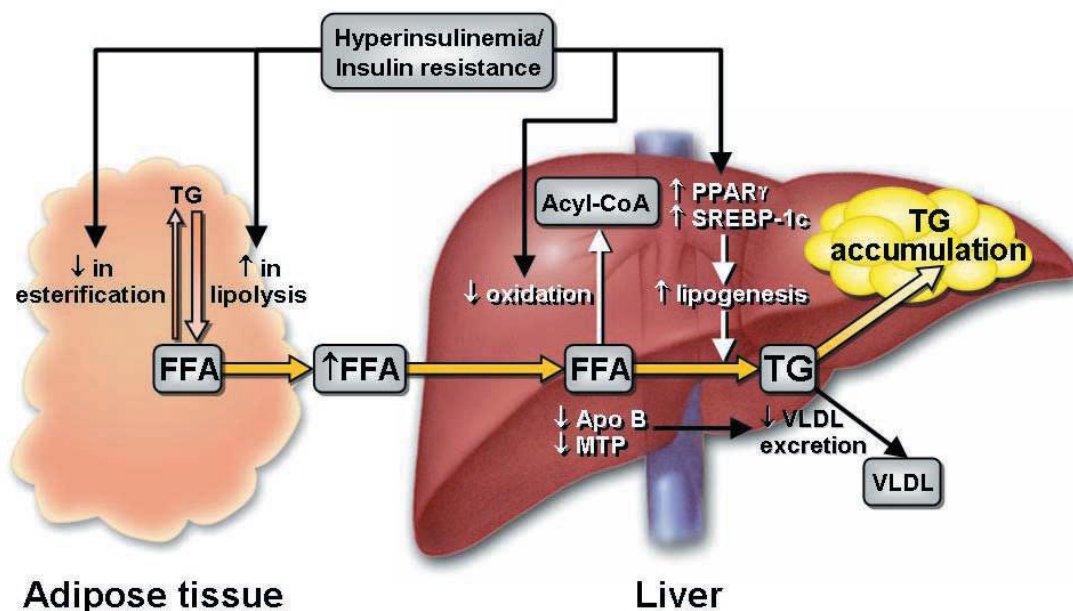


Figura 26. Esquema de los mecanismos implicados en el desarrollo de NAFLD. Extraída de Adams y col., 2005 [337].

Además del incremento en la lipogénesis hepática, el TNF α y otras citoquinas proinflamatorias juegan un papel central en el desarrollo de la NAFLD [361-363]. La inducción de citoquinas proinflamatorias se da en parte por el estrés oxidativo que generan los niveles elevados de ácidos grasos libres intrahepáticos y está implicada en las complicaciones de la esteatosis a esteatohepatitis y cirrosis [337]. Esto está apoyado por diferentes estudios en los que se han encontrado niveles elevados de TNF α en pacientes con NAFLD [364,365].

1.6 MODELOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE LA OBESIDAD, DMT2 Y NAFLD

Existen varios modelos murinos para el estudio del desarrollo, fisiopatología y consecuencias de la obesidad [366]. Entre ellos, los ratones C57BL/Ks db/db (db/db de aquí en adelante) y C57BL/6J ob (ob/ob en adelante) constituyen modelos ampliamente utilizados y bien caracterizados para el estudio de la obesidad y sus complicaciones, como la DMT2 o la NAFLD [367].

-En el caso de los ratones db/db, tienen una mutación autosómica recesiva puntual (G \rightarrow T) [368] en el gen del receptor de la leptina (Lepr^{db}), situado en el cromosoma 4 [369,370]. Esta mutación resulta en un codón STOP en el extremo 3' del ARNm del receptor de la leptina, dando lugar a la terminación prematura de este gen con su consecuente pérdida de función [368]. Esta pérdida de función y por tanto resistencia a la leptina provoca a nivel cerebral una falta de control sobre la saciedad, presentando hiperfagia. A las cuatro semanas de edad los ratones db/db desarrollan hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidad severa y DMT2 [371,372]. Además, presentan las complicaciones que conllevan estos desórdenes, como la NAFLD, neuropatía o retinopatía. Su muerte ocurre entre los cinco y ocho meses de edad [373].

-Por su parte, los ratones ob/ob portan una mutación en el gen que codifica la leptina (Lepr^{ob}), situado en el cromosoma 6 [374], que fue descubierta en los laboratorios Jackson en 1949 como una mutación autosómica recesiva [375]. La mutación ob es una mutación puntual (C \rightarrow T) que resulta en el cambio del residuo Arg105 por un codón STOP, generando una proteína truncada [252,369]. Por tanto, estos ratones son deficientes en leptina, por lo que igual que los db/db, no tienen control sobre su saciedad. A partir de las cuatro semanas presentan obesidad, hiperinsulinemia e hiperglicemia y diabetes ligeras y transitorias, que se normalizan tras las doce semanas de edad [367]. Además, estos ratones muestran un aumento en la lipogénesis *de novo* [376] y una disminución en la lipólisis [377].

3. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

El término de enfermedad cardiovascular es un concepto general que engloba las enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos, incluyendo la cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular e insuficiencia cardíaca como los tres problemas cardiovasculares más importantes [378].

Las ECV constituyen la primera causa de mortalidad en los países [379] y a principios de 2012, se estima que aproximadamente 17,5 millones de personas fallecieron a causa de las ECV, lo que representa un 31% de los fallecimientos globales. De ellos, aproximadamente 7,4 millones de fallecimientos se debieron a enfermedad coronaria [378]. Según el estudio *MONICA*, llevado a cabo en el 1997 [380], en el cual se estudió la tasa de mortalidad y de incidencia de las ECV, España tiene un puesto favorable en relación al resto de países, ya que presenta una mortalidad coronaria más baja que los demás países occidentales y una tasa de enfermedad cerebrovascular media entre ellos [381].

En relación a las ECV, también es importante mencionar el estudio de *Frahmingan*, llevado a cabo a partir de 1948, con una participación de 5209 hombres y en el que se demostraron las características que dan lugar a las ECV y se definió el concepto de factor de riesgo de las mismas [382].

Existen diferentes factores de riesgo de ECV, tanto no modificables como modificables. Entre los primeros, se encuentran la edad, el sexo, la raza y los marcadores genéticos. Así, existe más riesgo de padecer ECV en los individuos que pertenecen al sexo masculino, a partir de los 55 años, en la raza negra y con antecedentes familiares o rasgos genéticos influyentes [383]. Entre los factores de riesgo modificables, se encuentran la hiperlipidemia, hipertensión arterial, tabaquismo, DMT2 y obesidad [384,385].

La obesidad, sea de forma directa o en parte mediado por su impacto sobre diversos factores como la hipertensión, dislipemia, intolerancia a la glucosa y DMT2 [386], se ha convertido en una de las principales causas de ECV en los países desarrollados [387]. Esto puede ser debido a que el depósito de grasa visceral abdominal produce hormonas y mediadores inflamatorios que inducen resistencia a la insulina, cambios en el perfil lipídico o hipertensión arterial, además de actividad procoagulante y antifibrinolítica, lo que incrementa el riesgo de padecer DMT2 y ECV, denominándose riesgo cardiometabólico [388,389] (Figura 27).

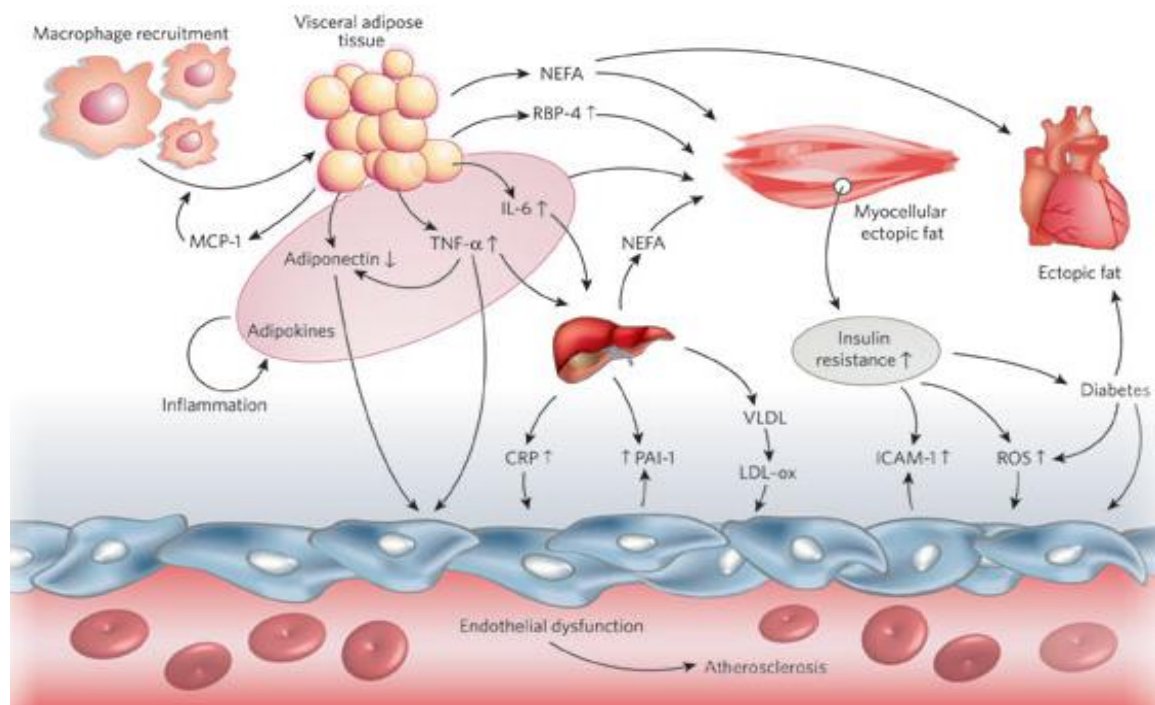


Figura 27. Mecanismos que median la relación entre la obesidad y la enfermedad cardiovascular. Extraída de Van Gaal MF y col., 2006 [389].

Mediante el estudio de Framingham, se demostró que el grado de obesidad constituye un buen predictor, a largo plazo, de la incidencia de ECV [384], lo que se hacía aun más patente entre personas menores de 50 años [390]. Además, entre las mujeres, sólo la edad y la presión sanguínea eran predictores de ECV más robustos que el grado de obesidad [384]. El reciente estudio *DARIOS* de Felix- Redondo y col. [391], apoya esta relación en la población española, en la que encuentra una asociación independiente de la edad entre obesidad y enfermedades coronarias, subrayando como factores de riesgo de ECV a 10 años el IMC, el diámetro de la cintura y el índice cintura-cadera (WHtR) [391]. De hecho, un mayor WHtR constituye un predictor más fuerte de ECV que el IMC [392].

3.1 LA DIETA MEDITERRÁNEA COMO PATRÓN NUTRICIONAL EN LA PREVENCIÓN DE ECV

Del estudio *Seven Countries Study*, realizado en 1958 por Keys y col., surgió el concepto de Dieta Mediterránea [393-395]. En este estudio se mostró la baja incidencia de enfermedad coronaria, ciertos tipos de cáncer y mayor esperanza de vida en habitantes de Creta, en Grecia, a pesar del gran consumo de grasa que hacían [396]. Posteriormente, diferentes publicaciones han demostrado que la adherencia a la Dieta Mediterránea disminuye la tasa de muerte a causa de ECV [397-404]. Entre

ellas, podemos destacar estudios como el *Lyon Diet Heart Study*, en el que 605 pacientes con ECV, al cabo de seis meses de adherencia a la Dieta Mediterránea, vieron disminuidos los eventos cardiovasculares [405]. El estudio *HALE*, por su parte, muestra que la adherencia a la Dieta Mediterránea durante seis meses disminuye la tasa de mortalidad en ancianos [398]. En otro estudio bastante reciente, el estudio *PREDIMED*, se ha observado en un grupo de 7400 personas que el consumo de dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva extra virgen o nueces reduce el riesgo cardiovascular en un 30% con respecto al grupo control [397,406]. Con estos estudios se ha puesto de manifiesto, además del efecto cardiosaludable de la dieta Mediterránea, su asociación a una mayor esperanza de vida, bajo riesgo de padecer obesidad, síndrome metabólico y DMT2.

En la Conferencia Internacional sobre las Dietas Mediterráneas celebrada en Boston a principio de los 90, se definió el patrón que caracteriza la Dieta Mediterránea: un consumo elevado de cereales, verduras, legumbres, fruta, poca carne y mucho pescado, consumo relativamente reducido de lácteos, consumo moderado de vino tinto y aceite de oliva como principal grasa culinaria, dándose una relación alta entre la proporción de grasas monoinsaturadas (MUFA) con respecto a las grasas saturadas (SFA) [407-409] (Figura 28).



Figura 28. La pirámide tradicional de la Dieta Mediterránea. Extraída de Willet y col.,1995 [409].

3.1.1 EL ACEITE DE OLIVA: ALIMENTO IMPRESCINDIBLE EN LA DIETA MEDITERRÁNEA

El aceite de oliva representa uno de los pilares básicos de la Dieta Mediterránea y es la mayor fuente de grasa procedente de la dieta en los países donde se cultivan olivas [410]. Diferentes estudios han puesto de manifiesto el efecto protector del aceite de oliva sobre la ECV. Entre ellos, un estudio español en el que el consumo de aceite de oliva se asoció con una reducción del 82% en el riesgo de sufrir un primer infarto de miocardio [411]. En otro estudio con una cohorte griega, se encontró una asociación negativa entre el ratio MUFA/SFA y la mortalidad por ECV [402]. También en un estudio reciente el aceite de oliva extra virgen mejoró la glucosa post-prandial y los niveles de LDL [412].

El ácido graso principal y componente mayoritario del aceite de oliva es el ácido oleico, un MUFA cis omega 9 (C18:1n-9) cuya abundancia en el aceite de oliva se encuentra en el rango entre 56-84% del total de los ácidos grasos, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido linoleico están presentes comunmente entre un 4 y un 20% [413] y los SFAs entre un 8 y un 14% [414].

A través de estudios epidemiológicos, de los MUFAs y especialmente del ácido oleico se conocen efectos beneficiosos sobre la ECV [415-418], el perfil lipídico [419] y actividades antitrombogénica y antitumoral [420,421]. Así mismo se ha demostrado su efecto beneficioso sobre la sensibilidad a la insulina [417,422,423] y su efecto hipotensor [424].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La SHBG es una glicoproteína producida por el hígado humano y secretada al torrente circulatorio, donde une andrógenos y estrógenos con gran afinidad regulando su disponibilidad y accesibilidad a nivel de tejido. Niveles bajos de SHBG se encuentran en pacientes obesos de todas las edades. Además, los pacientes con síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico o PCOS presentan niveles plasmáticos bajos de SHBG, que también se correlacionan de forma independiente con el riesgo de sufrir DMT2 y ECV. Con esta base, el objetivo principal de esta tesis es profundizar en el estudio de la regulación de la SHBG y su papel en el desarrollo de la obesidad y patologías asociadas. Para estudiarlo, nos hemos propuesto varios objetivos específicos partiendo de las hipótesis que planteo a continuación.

HIPÓTESIS 1

Los niveles plasmáticos de SHBG se encuentran bajos en pacientes obesos independientemente de la edad y el sexo. A medida que se desarrolla la obesidad los niveles de SHBG van disminuyendo. Sin embargo, no existe ningún modelo murino para estudiar la regulación de la SHBG durante el desarrollo de la obesidad.

OBJETIVO 1

Desarrollar un ratón transgénico que exprese SHBG y desarrolle obesidad, mediante el cruce entre un ratón transgénico para la SHBG y un ratón db/db.

HIPÓTESIS 2

La SHBG, además de ser un marcador de enfermedades metabólicas, como el síndrome metabólico, la obesidad, NAFLD, PCOS y predictor de la ECV y DMT2, juega un papel en su desarrollo.

OBJETIVO 2

Estudiar el papel de la SHBG en el desarrollo de la NAFLD en dos modelos animales de NAFLD: un modelo genético (SHBG-db/db) y un modelo inducido por dieta rica en fructosa (shbg/wild-type).

HIPÓTESIS 3

La SHBG se encuentra regulada por diferentes factores metabólicos y nutricionales:

3.1 Los niveles de adiponectina, al igual que la SHBG, están relacionados negativamente con el índice de masa corporal y se encuentran niveles bajos en pacientes obesos; por otro lado, existe una relación positiva entre los niveles de adiponectina y SHBG y la regulación negativa de la adiponectina que ocurre en los pacientes obesos parece participar en el desarrollo de la esteatosis hepática no alcohólica que está asociada con niveles bajos de SHBG. Con esta base, hemos hipotetizado que la adiponectina puede regular la producción de SHBG.

OBJETIVO 3.1

Estudiar la regulación hepática de la SHBG por la adiponectina y los mecanismos moleculares por los que se produce.

3.2 Puesto que la dieta Mediterránea protege frente al desarrollo de ECV y los bajos niveles de SHBG son un factor de riesgo de las mismas, hemos hipotetizado que el efecto beneficioso de los alimentos de la dieta Mediterránea podría estar mediado por un aumento en los niveles de SHBG.

OBJETIVO 3.2

Estudiar la regulación hepática de la SHBG por el aceite de oliva, uno de los componentes principales de la dieta Mediterránea y los mecanismos moleculares implicados en tal regulación.

La consecución de estos objetivos se ha traducido en las publicaciones que integran la sección de resultados.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

DESARROLLO DE UN MODELO DE RATÓN DOBLE TRANSGÉNICO, SHBG-C57BL/KSJ-DB/DB, PARA ESTUDIAR LA EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE LA SHBG DURANTE EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD.

Los niveles plasmáticos de SHBG se encuentran bajos en pacientes obesos de todas las edades y predicen el desarrollo de DMT2 y ECV. Aun no se conoce la regulación de la SHBG durante el desarrollo de la obesidad debido a que no se ha podido estudiar en ningún modelo murino de obesidad, porque los ratones no expresan SHBG en el hígado, y por tanto, carecen de SHBG circulante. Para ello, hemos desarrollado un modelo de ratón doble transgénico SHBG-C57BL/ksJ-db/db (SHBG-db/db de aquí en adelante), a partir, por un lado, del modelo de ratón C57BL/ksJ-db/db (db/db de aquí en adelante) que desarrolla obesidad y DMT2 y ha sido ampliamente utilizado en el estudio de estas dos patologías; por otro lado, del ratón transgénico para la SHBG, desarrollado en la década de los 90 y que expresa SHBG en el hígado y la secreta a la sangre. Mediante el cruce de estos dos ratones se ha conseguido un modelo de ratón diabético y obeso que tiene SHBG circulante. El estudio de la expresión y regulación de la SHBG en este modelo de ratón nos ha permitido analizar por un lado, qué conlleva la sobreexpresión de la SHBG en la obesidad (comparando el ratón db/db con el ratón SHBG-db/db) y por otro lado estudiar qué mecanismos de regulación dan lugar a los bajos niveles de SHBG encontrados en los pacientes obesos (mediante la comparación del ratón delgado SHBG-db/+ con el ratón obeso SHBG-db/db).

En primer lugar, la sobreexpresión de la SHBG en el ratón obeso db/db produce una disminución del peso total de machos y hembras, sin embargo, no produce cambios significativos en su perfil metabólico, en términos de niveles plasmáticos de glucosa, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, insulina y leptina.

Puesto que los pacientes obesos suelen desarrollar NAFLD, condición en la que también disminuyen los niveles de SHBG, estudiamos si estos ratones obesos que sobreexpresan la SHBG desarrollan hígado graso y si sus niveles de SHBG están disminuidos con respecto a los ratones delgados SHBG-db/+. Encontramos que los ratones SHBG-db/db, tanto machos como hembras, presentan una importante acumulación lipídica en el hígado, así como un aumento en los triglicéridos hepáticos. Los niveles de expresión y de proteína circulante de SHBG en estos ratones obesos y diabéticos SHBG-db/db son menores que en los ratones delgados SHBG-db/+. Esta disminución se produce por una reducción en los niveles hepáticos de ARNm y proteína del factor de transcripción HNF-4 α y por un aumento de expresión y proteína de PPAR γ , tanto en machos como en hembras SHBG-db/db obesos en comparación con los ratones SHBG-db/+ delgados, que da lugar a una menor unión de HNF-4 α y una mayor unión de PPAR γ al promotor de la SHBG. Estos resultados se comprobaron en biopsias hepáticas de pacientes obesos, en las que los niveles de expresión de SHBG se correlacionaron positivamente con los niveles de expresión de HNF-4 α y negativamente con los niveles de expresión de PPAR γ 2. Finalmente, observamos que los niveles de testosterona total en los ratones obesos SHBG-db/db fueron menores que en los ratones delgados SHBG-db/+.

RESULTADOS

Por tanto, nuestro modelo de ratón SHBG-db/db representa lo que ocurre en humanos obesos en términos de reducción de testosterona y SHBG plasmática. Además, nos ha permitido estudiar los mecanismos por los que los niveles de SHBG se reducen durante el desarrollo de la obesidad y constituye una herramienta muy valiosa para el estudio del papel de la SHBG en el desarrollo y progresión de enfermedades en las que se encuentran sus niveles disminuidos, tales como la obesidad, la NAFLD o la DMT2.

SHBG-C57BL/ksJ-db/db: A New Mouse Model to Study SHBG Expression and Regulation During Obesity Development

Cristina Saéz-López, Marta Rivera-Giménez, Cristina Hernández, Rafael Simó, and David M. Selva

Diabetes and Metabolism Research Unit, Vall Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (Instituto Carlos III), 08035 Barcelona, Spain

Low plasma sex hormone-binding globulin (SHBG) levels in overweight individuals are a biomarker for the metabolic syndrome and are predictive of type 2 diabetes and cardiovascular disease risk. There are no *in vivo* models to study SHBG expression and regulation during obesity development. The main reason for this is that the obesity-prone rodent models cannot be used to study this issue, because rodents, unlike humans, do not express the *SHBG* gene in their livers. We have developed a unique mouse model that expresses the human SHBG, and it develops obesity, by crossing the human *SHBG* transgenic mice with the C57BL/ksJ-db/db mice. The results obtained with the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mouse model have allowed us to determine that the SHBG overexpression in the C57BL/ksJ-db/db reduced the body weight gain but did not change the metabolic profile of these mice. Moreover, we elucidated the molecular mechanisms and transcription factors causing the SHBG down-regulation during obesity development, which involved changes in liver hepatocyte nuclear factor 4 α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ mRNA and protein levels. Furthermore, these results were confirmed using human liver biopsies. Importantly, we also showed that this model resembles what occurs in human obese subjects, because plasma SHBG and total testosterone levels were reduced in obese mice when compared with lean mice. Future research using this unique mouse model will determine the role of SHBG in the development and progression of obesity, type 2 diabetes, or fatty liver disease. (*Endocrinology* 156: 4571–4581, 2015)

Sex hormone-binding globulin (SHBG) is produced by the human liver under control of hormones and nutritional factors (1, 2). The human liver secretes SHBG to the blood where it binds sex steroids with high affinity regulating their bioavailability (3). Body mass index (BMI) is a major determinant of SHBG concentration in the blood of men and women (4, 5). Low serum SHBG levels in overweight individuals are a biomarker for the metabolic syndrome (6, 7) and are predictive of type 2 diabetes (8, 9) and cardiovascular disease risk (10, 11).

There are no *in vivo* models to study SHBG expression and regulation during obesity development. The main rea-

son for this is that the obesity-prone rodent models cannot be used to study this issue, because rodents, unlike humans, do not express the *SHBG* gene in their livers (12–17); instead, they express the SHBG in the Sertoli cells of the testis (18–20). Rodents do not have SHBG in their bloods (21) and only new world monkeys and chimpanzees have the same exact gene structure in terms of promoters and footprint regions (22). Several works in recent decades, mainly using HepG2 cells in *in vitro* experiments, have identified the transcription factors binding to these regions (22–24). In this regard, it has been reported that hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) α and chicken

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in USA
Copyright © 2015 by the Endocrine Society
Received July 31, 2015. Accepted September 30, 2015.
First Published Online October 6, 2015

Abbreviations: ACC, Acetyl-CoA carboxylase; ApoB, Apolipoprotein B; ACLY, ATP citrate lyase; BMI, body mass index; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Cyp2d9, Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 9; FP, footprint region; HNF-4, hepatocyte nuclear factor 4; LXR, Liver X receptor; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PPIA, Peptidylprolyl Isomerase A; SHBG, sex hormone-binding globulin; UHVH, University Hospital Vall d'Hebron; VAT, visceral adipose tissue.

ovalbumin upstream promoter-transcription factor bind to footprint region 1 (FP1) and/or FP3. In addition, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ is able to bind to the FP3, and upstream stimulatory factors can bind to the FP4 region of the *SHBG* promoter (22–24). Moreover, in the last few years, several works have described that the modulation of HNF4 α or PPAR γ protein levels is another mechanism which governs hepatic SHBG production. In this regard, thyroid hormones (25) and adiponectin (26) regulate SHBG production by increasing hepatic HNF4 α protein levels, whereas carbohydrate-induced de novo lipogenesis (2), TNF α (27, 28), and IL-1 β (29) regulate SHBG production by decreasing hepatic HNF4 α protein levels. Moreover, oleic acid increases SHBG production by reducing PPAR γ levels (30).

The lack of in vivo models to study SHBG regulation during obesity development was the main reason for developing a new mouse model that expresses SHBG and develops obesity and its associated complications (eg, fatty liver, type 2 diabetes, and cardiovascular disease). The characterization of these mice would allow us to study the molecular mechanisms that govern SHBG production during obesity development and to confirm our previous in vitro findings using HepG2. Furthermore, different therapies aimed at increasing SHBG could be tested using this unique mouse model.

To establish this new mouse model, we have taken advantage of having the human *SHBG* transgenic mice. These mice express the human *SHBG* gene under the control of its own human promoter and express the human SHBG in their livers and kidneys, which results in the presence of SHBG in blood and urine (31, 32). The blood levels of SHBG in this model are almost 10-fold higher than in humans (32). The *SHBG* transgenic mouse has been well characterized and used extensively to study human SHBG expression and regulation (2, 22, 24, 25, 28–32). We have developed a unique mouse model that expresses the human SHBG and it develops obesity, by crossing the human *SHBG* transgenic mice with the C57BL/ksJ-db/db mice. The C57BL/ksJ-db/db mice are characterized by having a point mutation in the leptin receptor, which in homozygosis the lack of leptin signaling in the hypothalamus will lead to persistent hyperphagia, obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and fatty liver (33, 34). These manifestations are apparent from 4 weeks of age and death occurs at approximately 5–8 months of age.

The characterization of this new SHBG-C57BL/ksJ-db/db mouse model have allowed us to determine the molecular mechanisms and transcription factors involved in the down-regulation of SHBG during obesity development. These mechanisms of SHBG down-regulation involved changes in hepatic HNF-4 α and PPAR γ mRNA

and protein levels. Furthermore, these results were confirmed using a small set of human liver biopsies. Importantly, we also showed that this model resembles what occurs in human obese subjects, because plasma SHBG and total testosterone levels were reduced in obese mice when compared with lean mice. Future research using this unique mouse model will determine whether SHBG is a merely biomarker for metabolic disorders or whether it plays an active role in the development and progression of obesity, type 2 diabetes, or fatty liver disease.

Materials and Methods

Animals

The human *SHBG* transgenic mice were backcrossed onto C57BL/ksJ-db/db background in order to obtain mice expressing human *SHBG* and developing obesity and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Mice were maintained under standard conditions with food (Global Diet 2018; Harlan Interfauna Iberica) and water provided ad libitum and a 12-hour light, 12-hour dark cycle. Experimental procedures were approved by the Institutional Animal Use Subcommittees of University Hospital Vall d'Hebron (UHVH) Research Institute and the Universitat Autònoma Barcelona (45/13 CEEA).

In vivo experiments

One set of male mice of the 4 genotypes (C57BL/ksJ-db/+, C57BL/ksJ-db/db, SHBG-C57BL/ksJ-db/+, and SHBG-C57BL/ksJ-db/db) $n = 5$ each were followed up to 12 weeks. Blood samples were taken by saphenous vein for measurements of plasma SHBG levels every 2 weeks. Another set of male and female mice of each genotype ($n = 5$) was killed at 6 weeks of age and blood and tissues were collected and weighted for RNA and protein isolation.

Subjects and samples

We recruited 15 obese subjects (BMI median 42.27 kg/m²; range, 32.61–52.31 kg/m²) of Caucasian origin who underwent bariatric surgery at the UHVH. The main clinical features are shown in Table 1. None of the subjects had evidence of metabolic disease other than obesity, and patients with type 2 diabetes were

Table 1. Main Clinical Characteristics and Biochemical Parameters of Obese Patients in Whom Liver Biopsy Was Performed

Age (y)	58 \pm 8
Gender (M/F)	4/11
BMI (kg/m ²)	42.27 \pm 4.62
Fasting glucose (mmol/L)	5.44 \pm 1.09
Total cholesterol (mmol/L)	5.39 \pm 0.98
HDL-C (mmol/L)	1.29 \pm 0.22
LDL-C (mmol/L)	3.40 \pm 0.87
TGs (mmol/L)	1.67 \pm 0.63
AST (μ kat/L)	0.32 \pm 0.08
ALT (μ kat/L)	0.39 \pm 0.21
GGT (U/L)	40.08 \pm 16.68

excluded. Blood samples were collected before surgery from the antecubital vein, plasma was separated immediately by centrifugation, and aliquots were frozen at -80°C for subsequent analysis. Liver biopsies were obtained using a fine needle. All biopsies were at least 2 cm in length and contained at least 8 portal tracts. Samples were frozen at -80°C for subsequent analysis. Informed written consent was obtained from all participants, and the study was approved by the human ethics committee from the UHVH.

SHBG measurements

Human SHBG levels from mice plasma were measured using an ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH). The Demeditec SHBG ELISA kit is a solid phase ELISA based on the sandwich principle. The microtiter wells were coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards a unique antigenic site of the SHBG molecule. After the incubation and wash step, the enzyme solution, which contains a monoclonal anti-SHBG conjugated with horseradish peroxidase was added. After incubation, the unbound conjugate was washed off. The amount of bound peroxidase was proportional to the SHBG concentration of the sample. The assay dynamic range was between 0.77–260 nmol/L. Intra- and interassay variability was between 3%–9%.

Testosterone measurements

Total testosterone plasma levels from mice plasma were measured using ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH).

RNA analysis

Total RNA was extracted from mouse livers and human liver samples using TRIzol reagent (Invitrogen SA). Reverse transcription was performed at 42°C , for 50 minutes using 3 μg of total RNA and 200 U of Superscript II together with an oligo-dT primer and reagents provided by Invitrogen. An aliquot of the reverse transcription product was amplified in a 25- μL reaction using SYBRGreen (Invitrogen SA) with appropriate oligonucleotide primer pairs corresponding to mouse HNF-4 α , mouse PPAR γ , mouse 18S and human SHBG, human HNF-4 α , human PPAR γ 2, and human 18S (Supplemental Table 1). Results were analyzed using the 7000 SDS program.

Western blot analysis

Mouse livers and human liver samples were homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer with Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Protein extracts were used for Western blotting with antibodies against HNF-4 α (C-19, catalog sc-6556; Santa Cruz Biotechnology, Inc), PPAR γ (H-100, catalog sc-7196; Santa Cruz Biotechnology, Inc), and Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) (SA-296; BIOMOL Int) (Table 2). Specific antibody-antigen complexes were identified using the corresponding horseradish peroxidase-labeled rabbit anti-

goat IgG, rabbit antimouse IgG, or goat antirabbit IgG and chemiluminescent substrates (Millipore) by exposure to x-ray film.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

Mice livers were used to perform ChIP assays with a ChIP-IT kit (Active Motif, Inc) with HNF-4 α , PPAR γ , rabbit IgG, or goat IgG. The purified DNA was subjected to PCR amplification (35 cycles) using specific primers designed to amplify a 262-bp region of the human SHBG promoter (Supplemental Table 1).

Statistical analyses

Normal distribution of the variables was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparison of quantitative variables was performed by either the Student's *t* test or Mann-Whitney test according to the data distribution. All data are presented as mean \pm SD or mean \pm SEM. Spearman's correlation coefficients were used to establish the association between SHBG levels and the other parameters. For graphics, a linear regression test was applied. Significance was accepted at the level of $P < .05$. Statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (SPSS, Inc).

Results

SHBG overexpression reduces total body weight gain but does not contribute to improve the metabolic profile in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db

Obese C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had progressively higher body weight than their lean C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+ littermates with increasing age from 6 to 12 weeks of age (Figure 1A). Remarkably, SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice showed a significant reduction (15%–20%) in body weight when compared with C57BL/ksJ-db/db mice (Figure 1A). Blood glucose levels remained low and constant in lean C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice, whereas obese C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice developed hyperglycemia after 6 weeks of age (Figure 1B). There were no significant differences in glucose levels between C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice (Figure 1B).

We next analyzed the weight of several tissues of lean (C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+) and obese (C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db) mice at 6 weeks of age. The results showed significantly higher liver, adipose tissue and kidney weight in obese (C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db) male and female mice when compared with lean (C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+) mice (Table 3). Importantly, SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice had significantly reduced liver weight when compared with C57BL/ksJ-db/db mice (Table 3). Moreover, obese male and female SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had significantly re-

Table 2. Antibody Table

Peptide/Protein Target	Antigen Sequence (if Known)	Name of Antibody
HNF-4 α		Human HNF-4 α
PPAR γ		Human PPAR γ
PPIA		PPIA

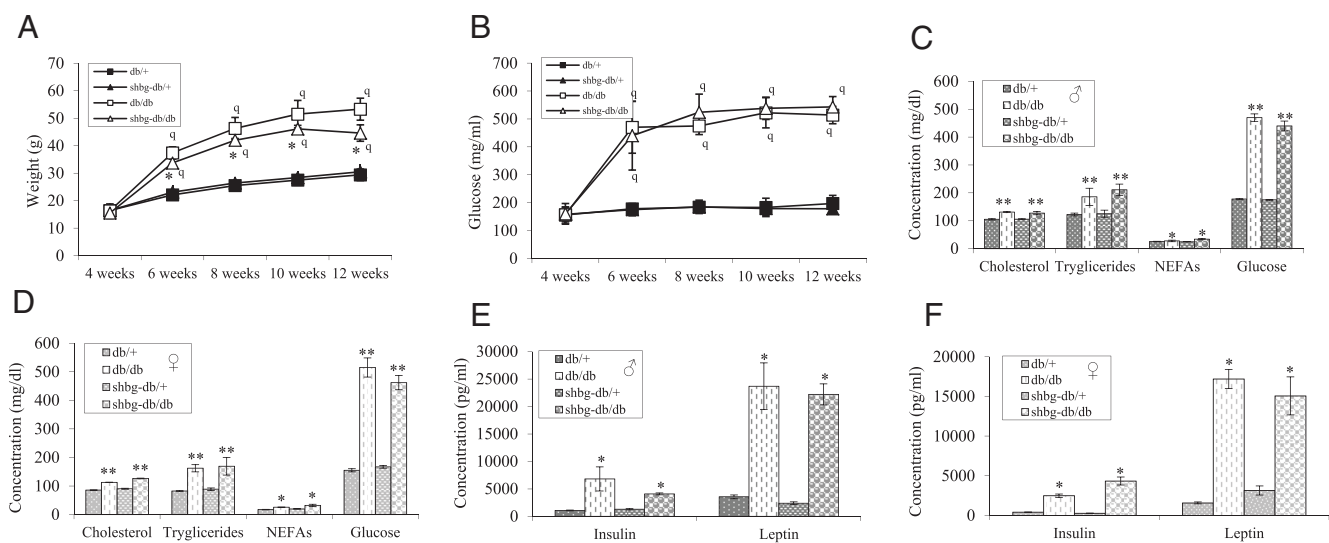


Figure 1. SHBG reduces total body weight but does not contribute to improve metabolic profile. **A**, Weight of 1 set of male mice of the 4 genotypes (C57BL/ksJ-db/+, C57BL/ksJ-db/db, SHBG-C57BL/ksJ-db/+, and SHBG-C57BL/ksJ-db/db); $n = 5$ each was followed up to 12 weeks. Data points are mean \pm SEM. q, $P < .05$ when compared C57BL/ksJ-db/db or SHBG-C57BL/ksJ-db/db vs C57BL/ksJ-db/+ or SHBG-C57BL/ksJ-db/+; *, $P < .05$ when compared C57BL/ksJ-db/db vs SHBG-C57BL/ksJ-db/db. **B**, Blood glucose levels of the same set of mice were followed up to 12 weeks. Data points are mean \pm SEM. q, $P < .05$. **C**, Plasma cholesterol, TGs, and NEFAs were measured in another set of male mice of the 4 genotypes killed at week 6. **D**, Plasma cholesterol, TGs, and NEFAs were measured in another set of female mice of the 4 genotypes killed at week 6. **E**, Insulin and leptin were measured in another set of male mice of the 4 genotypes killed at week 6. **F**, Insulin and leptin were measured in another set of female mice of the 4 genotypes killed at week 6. Data points are mean \pm SEM. *, $P < .05$ and **, $P < .01$ when compared with db/db or SHBG-C57BL/ksJ-db/db vs db/+ or SHBG-C57BL/ksJ-db/+.

duced visceral adipose tissue (VAT) weight when compared with C57BL/ksJ-db/db mice (Table 3).

The metabolic profile analysis showed that obese male and female C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db had higher plasma cholesterol, triglycerides (TGs), nonsterified fatty acids (NEFAs), glucose, insulin and leptin than lean male and female C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice (Figure 1, C–F). No significant differences were found between C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice (Figure 1, C–F).

Obese human SHBG-C57BL/ksJ-db/db transgenic mice develop fatty liver and have reduced SHBG production

It is well known that plasma SHBG levels are reduced in human obesity (4, 5). NAFLD, characterized by an increase in hepatic TG content, is usually found in obese subjects (35). We therefore wanted to study whether obese

SHBG-C57BL/ksJ-db/db developed NAFLD and whether this affected the SHBG gene regulation. For this purpose, we focused on lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice, because lean C57BL/ksJ-db/+ and obese C57BL/ksJ-db/db mice did not express SHBG.

We first analyzed the liver histology of lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice. The results showed that obese male and female SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had increased liver fat accumulation when compared with lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice (Figure 2, A and C). Analysis of the liver total TG content showed that obese male and female SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had increased TG in comparison with SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice (Figure 2, B and D).

We next measured the plasma SHBG levels in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-

Table 3. Weights of Different Tissues From Lean and Obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db Male and Female Mice

Genotype	Liver		VAT		Kidney		Testis	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
db/+	1.30 \pm 0.18	0.71 \pm 0.10	0.37 \pm 0.08	0.25 \pm 0.07	0.38 \pm 0.04	0.22 \pm 0.05	0.17 \pm 0.03	–
SHBG-db/+	1.40 \pm 0.06	0.83 \pm 0.16	0.31 \pm 0.12	0.38 \pm 0.16	0.39 \pm 0.05	0.22 \pm 0.05	0.14 \pm 0.05	–
db/db	2.60 \pm 0.30 ^a	2.30 \pm 0.17 ^a	1.90 \pm 0.20 ^a	2.20 \pm 0.30 ^a	0.44 \pm 0.05 ^a	0.35 \pm 0.05 ^a	0.15 \pm 0.05 ^a	–
SHBG-db/db	2.0 \pm 0.20 ^{a,b}	2.20 \pm 0.40 ^a	1.50 \pm 0.15 ^{a,b}	1.61 \pm 0.20 ^{a,b}	0.40 \pm 0.05 ^b	0.32 \pm 0.05 ^{a,b}	0.15 \pm 0.05	–

^a $P < .05$, lean (db/+ and SHBG-db/+) vs obese (db/db and SHBG-db/db).

^b $P < .05$, db/db vs SHBG-db/db.

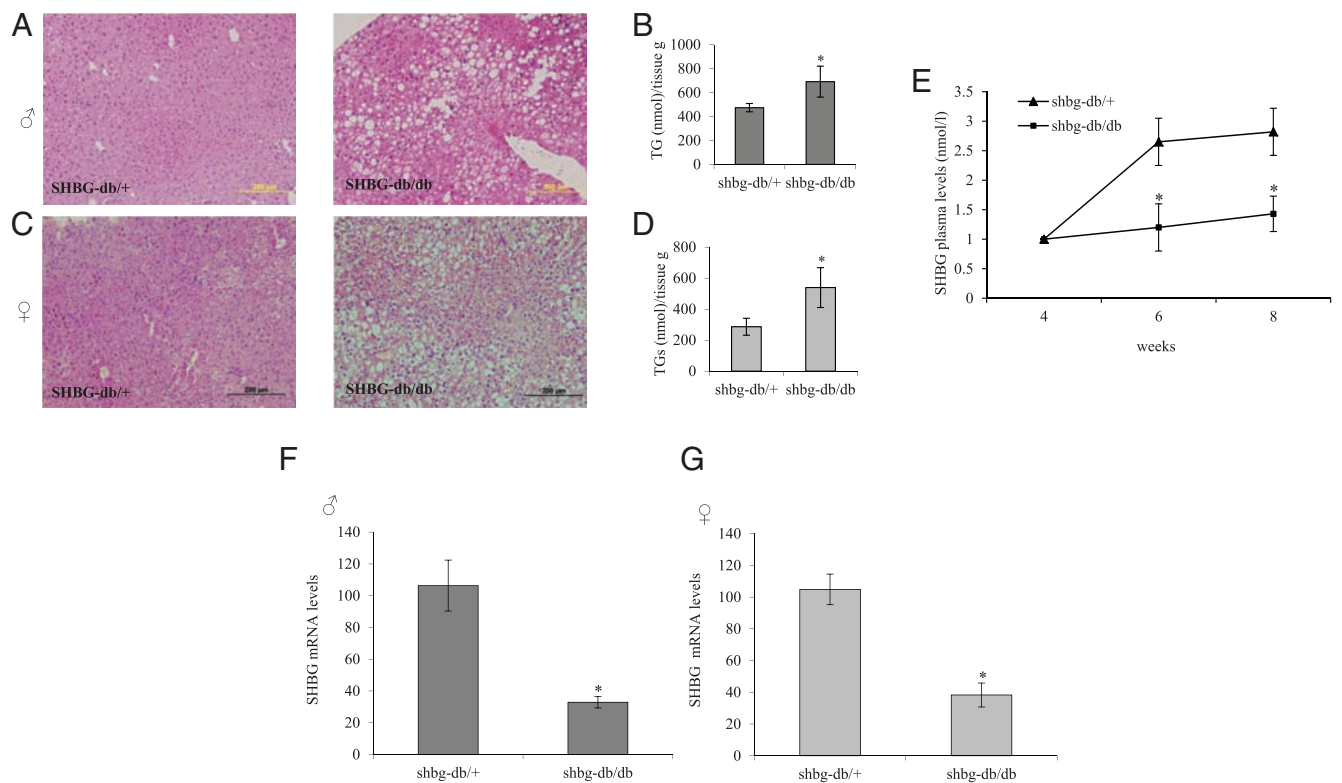


Figure 2. Obese human SHBG-C57BL/ksJ-db/db transgenic mice develop fatty liver and have reduced SHBG production. A, H&E histological examination of liver in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (SHBG-db/+) (left panel) and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db (SHBG-db/db) (right panel) male mice at 6 weeks of age ($n = 3$ each). B, Hepatic TGs measured in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice at 6 weeks of age ($n = 5$ each). C, H&E histological examination of liver in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (SHBG-db/+) (left panel) and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db (SHBG-db/db) (right panel) female mice at 6 weeks of age ($n = 3$ each). D, Hepatic TGs measured in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db female mice at 6 weeks of age ($n = 5$ each). E, Plasma SHBG levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice were measured every 2 weeks until week 8 by ELISA. F, SHBG mRNA abundance in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice was determined in relation to 18S RNA ($n = 3$ each). G, SHBG mRNA abundance in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/db female mice was determined in relation to 18S RNA ($n = 3$ each). Data points are mean \pm SEM. *, $P < .05$ and **, $P < .01$ when compared with SHBG-C57BL/ksJ-db/db vs SHBG-C57BL/ksJ-db/+.

db/db mice up to 8 weeks of age. Lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice showed an increase in plasma SHBG levels from 4 to 6 weeks of age, and the levels remained constant until 8 weeks (Figure 2E). Importantly, plasma SHBG levels in obese male SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice did not increase from week 4 to week 6 and remained lower at 8 weeks of age (Figure 2E).

Moreover, we determined the hepatic SHBG expression in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice at 6 weeks of age. The results showed that obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db male and female mice had a significant decrease in SHBG mRNA levels when compared with lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ in both male (Figure 2F) and female (Figure 2G) mice.

SHBG production is reduced by the alteration of hepatic HNF-4 α and PPAR γ mRNA and protein levels in human SHBG-C57BL/ksJ-db/db transgenic mice

In vitro experiments had previously demonstrated that HNF-4 α and PPAR γ transcription factors play a role in

the transcriptional activity of the human *SHBG* gene (23, 24). We wanted to analyze this in vivo in our new mouse model; in order to do so, we analyzed the hepatic HNF-4 α and PPAR γ levels in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db male and female transgenic mice. The results showed that obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had significantly reduced HNF-4 α mRNA levels when compared with lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ male (Figure 3A) and female (Figure 3B) mice. Moreover, we found that obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had significantly reduced HNF-4 α protein levels when compared with lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ male (Figure 3C) and female (Figure 3D) mice. The results also showed that PPAR γ mRNA levels are increased in SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with SHBG-C57BL/ksJ-db/+ male (Figure 3E) and female (Figure 3F) mice. Moreover, we found that PPAR γ protein levels are significantly increased in SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice in comparison with lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ male (Figure 3G) and female

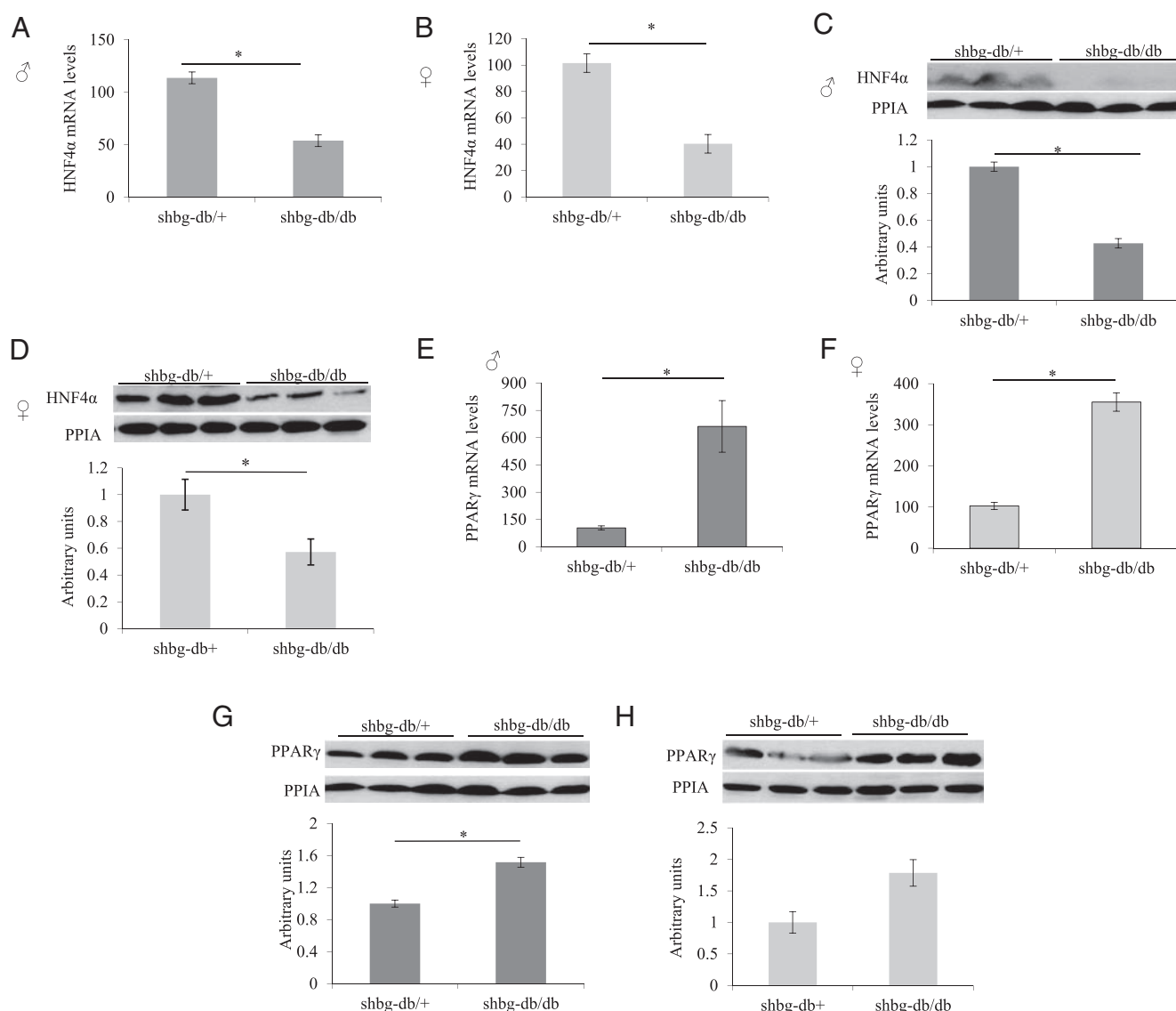


Figure 3. Hepatic SHBG production is reduced by the decrease of HNF-4 α and an increase in PPAR γ hepatic levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/db transgenic mice when compared with SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice. A, Liver HNF-4 α mRNA levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (n = 3) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db (n = 3) male mice were determined in relation to 18S RNA. B, Liver HNF-4 α mRNA levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (n = 3) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db (n = 3) female mice were determined in relation to 18S RNA. C, Liver HNF-4 α protein levels in male mice were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein. D, Liver HNF-4 α protein levels in female mice were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein. E, Liver PPAR γ mRNA levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (n = 3) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db (n = 3) male mice were determined in relation to 18S RNA. F, Liver PPAR γ mRNA levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (n = 3) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db (n = 3) male mice were determined in relation to 18S RNA. G, Liver PPAR γ protein levels in male mice were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein. H, Liver PPAR γ protein levels in female mice were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (n = 3) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db (n = 3) mice. Data points are mean \pm SEM. *, $P < .05$ and **, $P < .01$ when compared SHBG-C57BL/ksJ-db/db vs SHBG-C57BL/ksJ-db/+.

(Figure 3H) mice. Furthermore, SHBG mRNA levels correlated positively with HNF-4 α mRNA and negatively with PPAR γ mRNA levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice (Figure 4, A and B).

Finally, to demonstrate that SHBG down-regulation in obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice was caused by the decrease in HNF-4 α and the increase in PPAR γ protein levels, we performed ChIP assays using DNA/protein complexes extracted from livers of lean SHBG-C57BL/ksJ-

db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db transgenic mice. The results indicated that SHBG promoters from obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had less HNF-4 α and more PPAR γ binding than in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice (Figure 4C). To further support this, we also analyzed several hepatic target genes of HNF-4 α (Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 9 (Cyp2d9) and Apolipoprotein B (ApoB)) and PPAR γ (Acetyl-CoA carboxylase (ACC), ATP citrate lyase (ACLY), and Liver X

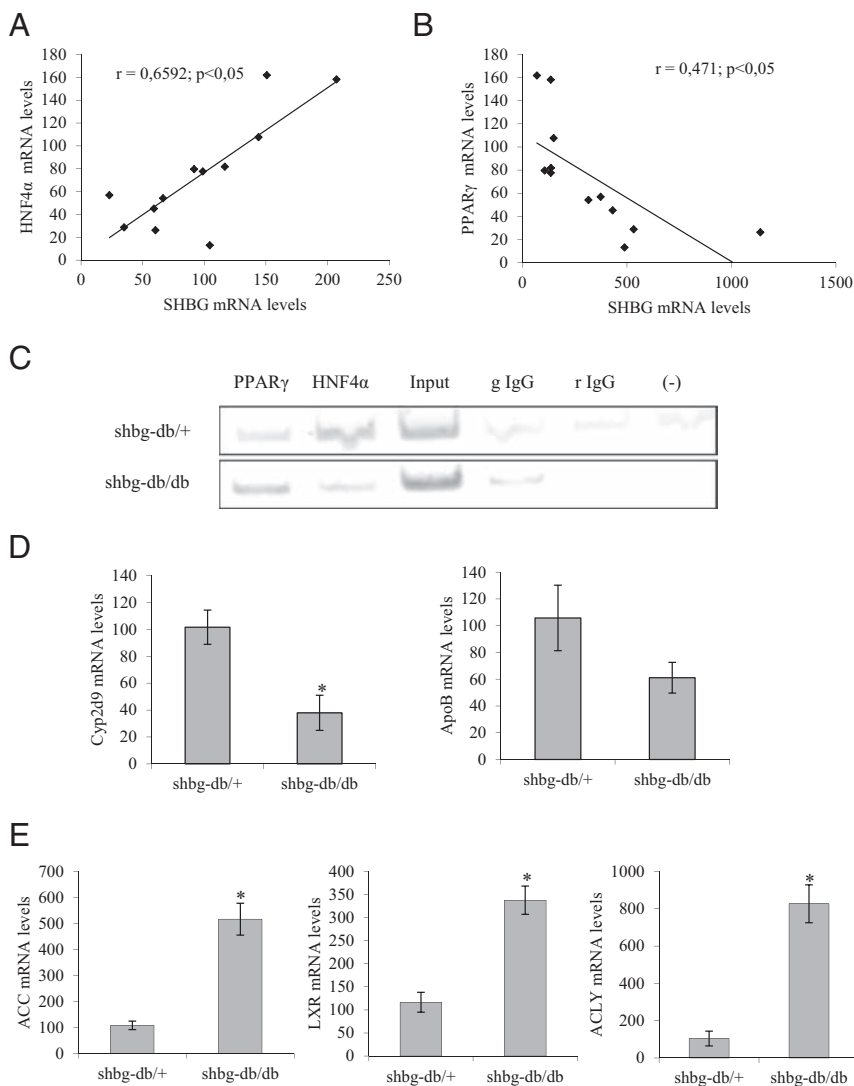


Figure 4. Hepatic SHBG production is reduced by alterations in HNF-4 α and PPAR γ hepatic levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/db transgenic mice when compared with SHBG-db/+ mice. A, Correlation between SHBG and HNF-4 α mRNA levels in livers of lean and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice ($n = 12$). B, Correlation between SHBG and PPAR γ mRNA levels in livers of lean and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice ($n = 12$). C, ChIP assay of HNF-4 α and PPAR γ binding to the human SHBG promoter in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ ($n = 3$) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db ($n = 3$) mice. Nonspecific goat and rabbit IgGs were used in ChIP reactions to control for nonspecific immunoprecipitation. Positive PCR controls of sheared genomic DNA templates indicated the integrity of the input DNA used in the ChIP reactions. D, Liver Cyp2d9 and ApoB mRNA levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ ($n = 3$) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db ($n = 3$) male mice were determined in relation to 18S RNA. E, Liver ACC, ACLY, and LXR mRNA in SHBG-C57BL/ksJ-db/+ ($n = 3$) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db ($n = 3$) male mice were determined in relation to 18S RNA. Data points are mean \pm SEM. *, $P < .05$ and **, $P < .01$ when compared with SHBG-C57BL/ksJ-db/+ vs SHBG-C57BL/ksJ-db/+.

receptor (LXR)). The results showed that mRNA levels of both HNF-4 α target genes (Cyp2d9 and ApoB) were significantly reduced in obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (Figure 4D). In contrast, mRNA levels of PPAR γ target genes (ACC, ACLY, and LXR) were significantly increased in obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (Figure 4E).

SHBG mRNA levels are associated with HNF-4 α and PPAR γ 2 mRNA expression in human liver biopsies

To explore whether our findings in terms of SHBG regulation found in our mouse model occur also in humans, we analyzed whether the SHBG mRNA levels correlate with the mRNA levels of HNF-4 α and PPAR γ 2 in 15 human liver biopsies. The results showed that SHBG mRNA levels correlate positively with HNF-4 α mRNA levels ($r = 0.621$, $P < .05$) and negatively with the PPAR γ 2 mRNA levels ($r = -0.643$, $P < .05$) (Figure 5, A and B).

Total testosterone plasma levels are reduced in human SHBG-C57BL/ksJ-db/db transgenic mice

Low testosterone plasma levels are usually present in human obese subjects (36–39). We therefore decided to measure total plasma testosterone levels in lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db male transgenic mice. The results showed that obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db had significantly lower total testosterone levels (14.6 ± 5.3 vs 42.5 ± 2.3) when compared with lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice.

Discussion

Low plasma SHBG levels are associated with obesity and are a risk factor for the development of both type 2 diabetes and cardiovascular disease (8–11). In fact, plasma SHBG

levels are used as a biomarker for different metabolic disorders (40–43). Rodents do not express SHBG in their livers and therefore all available obese-prone rodent models cannot be used to study the SHBG expression and regulation during obesity development. To give answer to this question, we have generated a new double transgenic mouse by crossing the human SHBG transgenic mice with the C57BL/ksJ-db/db mice. Although random integration

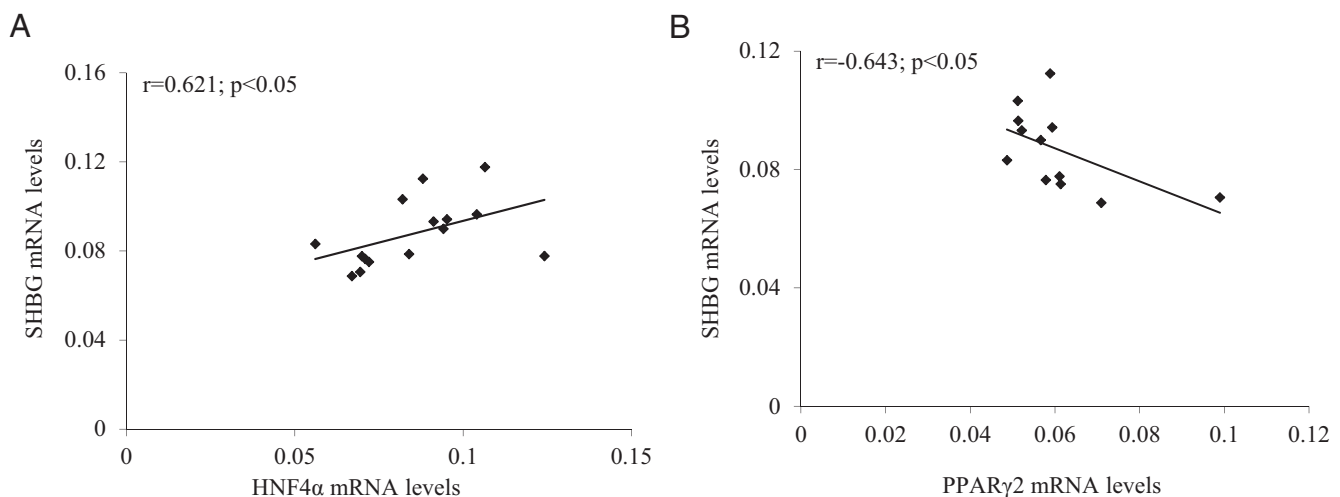


Figure 5. SHBG mRNA significantly correlates with HNF-4 α and PPAR γ mRNA levels in human liver biopsies. A, Correlation between SHBG and HNF-4 α mRNA levels in 15 human liver biopsies. B, Correlation between SHBG and PPAR γ 2 mRNA levels in 15 human liver biopsies.

of the transgene and possible position effects might theoretically affect SHBG regulation in the human *SHBG* transgenic mice, we believe that this is a valid model to study human *SHBG* gene regulation because the regulation of the *SHBG* gene resembles what occurs in the human hepatoblastoma HepG2 cell line and in human liver samples (2, 25, 27, 29). In this work, we have characterized this new humanized SHBG-C57BL/ksJ-db/db mouse model, and we have studied the mechanisms that regulate the SHBG expression in the development of obesity.

The C57BL/ksJ-db/db mouse model has been previously well characterized. These mice lack the leptin receptor, and they are obese, insulin resistant, and develop diabetes (44). The SHBG presence in our new humanized SHBG-C57BL/ksJ-db/db transgenic mouse model did not affect significantly the development of obesity, insulin resistance, and diabetes. However, the SHBG presence resulted in a reduction of body weight gain by about 15%–20%. This reduction in weight gain was mainly due to the

significant reduction of VAT when compared with their C57BL/ksJ-db/db littermates. This weight reduction is not negligible, because even a modest weight reduction of less than 10% in obese subjects appears to have beneficial effects on glycemic control, reduced blood pressure and cholesterol levels (45). However, we did not find any differences in blood glucose levels and lipids in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice in comparison with C57BL/ksJ-db/db. This could be attributed to the high degree of insulin resistance that exists in C57BL/ksJ-db/db mice.

Obese individuals commonly develop NAFLD, characterized by an increase in hepatic TG content (35). NAFLD is one of the metabolic diseases associated with low plasma SHBG levels (46). In the present study, we have showed that obese C57BL/ksJ-db/db mice had an increased fatty liver when compared with their lean C57BL/ksJ-db/+ littermates. Next, we studied the SHBG expression and regulation of SHBG during obesity development; we therefore followed lean SHBG-C57BL/ksJ-

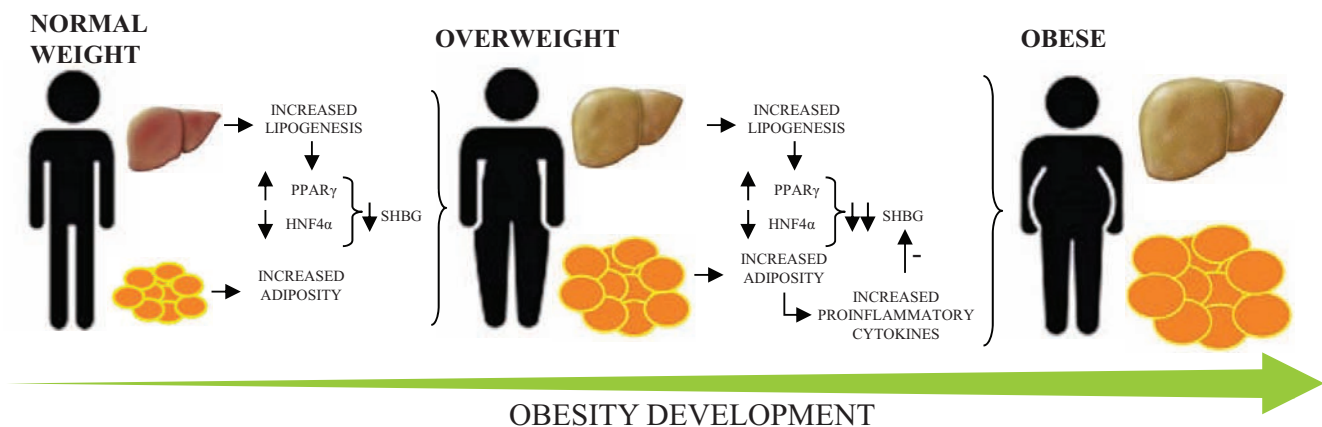


Figure 6. Diagram representing the molecular mechanisms of SHBG down-regulation during obesity development. We postulate that liver fat accumulation as a consequence of genetic and/or dietary factors is the main reason accounting for the reduction of plasma SHBG levels during obesity development. This decrease of plasma SHBG is caused by a reduction in HNF-4 α and the increase in PPAR γ protein levels.

db/+ and obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice during the first 8 weeks to analyze the plasma SHBG levels. Lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice showed a progressive increase in plasma SHBG levels during the first weeks of life and the levels remained constant from 6 to 8 weeks as previously described in the human *SHBG* transgenic mice (32). However, obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db plasma SHBG levels did not increase and levels remained low and constant during the 8 weeks of life. These results are in agreement with the fact that obese subjects of any age or sex showed low plasma SHBG levels (4, 5). These low plasma SHBG levels found in obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice were confirmed by the reduction in hepatic SHBG mRNA levels in these mice when compared with the mRNA levels of lean mice. This has been recently confirmed in humans by using mRNA from human liver biopsies (47).

In vitro studies using mainly HepG2 cells have demonstrated that *SHBG* gene expression is regulated by several transcription factors, among them HNF-4 α and PPAR γ play an important role (23, 24). In this regard, it has been described that HNF-4 α is the most important transcription factor that activates SHBG expression (2, 23, 25, 27–29), whereas PPAR γ has been identified as an inhibitor of SHBG expression (24, 48). The latter could seem contradictory, because it has been shown that thiazolidinediones, which activate PPAR γ , increase circulating SHBG levels (49–52). However, this effect is generally attributed to improved insulin resistance and/or glycemic control. Moreover, individuals homozygous for a PPAR γ_2 variant with an alanine at residue 12 (Ala12) have higher plasma SHBG levels than those who carry a PPAR γ_2 Pro12 allele. This is of interest because the PPAR γ_2 Ala12 variant is transcriptionally less active than the PPAR γ_2 Pro12 variant (53). In fact, it should also be noted that individuals who are homozygous for the PPAR γ_2 Ala12 allele have a lower BMI and better insulin sensitivity, both of which are linked to higher plasma SHBG levels (25). Our results showed that obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had reduced HNF-4 α and increased PPAR γ mRNA and protein levels when compared with the lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+, which caused a reduced binding of HNF-4 α and increased binding of PPAR γ at the *SHBG* promoter resulting in an inhibition of SHBG expression. These results were further confirmed in a small set of human male liver biopsies where we found a positive and significant correlation between SHBG and HNF-4 α mRNA levels and a negative and significant correlation between SHBG and PPAR γ_2 mRNA levels. Overall it could be postulated that liver fat accumulation as a consequence of genetic and/or dietary factors is the main reason accounting for the decrease of HNF-4 α and the increase of PPAR γ protein lev-

els. As we have previously reported, the increase in hepatic lipogenesis results in an enhancement of hepatocyte palmitate content which leads to a reduction in HNF-4 α protein levels (2). Regarding PPAR γ , lipid accumulation will probably increase the production of prostaglandins and leukotrienes, through lipoxygenase and cyclooxygenase activity, which finally leads to increased PPAR γ activity (Figure 6).

Epidemiological studies support a bidirectional relationship between serum testosterone and obesity as well as between testosterone and the metabolic syndrome. Low serum total testosterone predicts the development of central obesity and accumulation of intraabdominal fat (54–56). Both total and free testosterone and SHBG levels have been inversely related to an increased risk of developing the metabolic syndrome, independently of age and obesity (54–56). This is not easy to understand because it has been classically established that when SHBG decreases free testosterone increases. Therefore, the relationship between SHBG/total/free testosterone and the metabolic syndrome merits further investigation.

Our new humanized SHBG-C57BL/ksJ-db/db mouse model resembles what occurs in most of the human obese subjects, because obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had significantly lower total testosterone than lean SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice. Therefore, this new mouse model can be used to further study the insights of testosterone reduction during obesity development and therapies directed to increase testosterone levels in obese and type 2 diabetic subjects.

In conclusion, we have created the first mouse model that expresses human SHBG and develops obesity, NAFLD, and type 2 diabetes. The characterization of this new humanized SHBG-C57BL/ksJ-db/db mouse model has allowed us to determine that what occurs in these obese mice in terms of SHBG expression and regulation as well as in terms of testosterone reduction resembles what happens in human obesity. Therefore, future research using this unique mouse model will determine whether SHBG has a role in the development and progression of obesity, NAFLD, and type 2 diabetes.

Acknowledgments

We thank Dr Geoffrey L. Hammond, Head of the Department of Cellular and Physiological Sciences, University of British Columbia; this project would not have been possible without his collaboration in letting us use the human *SHBG* transgenic mice. We also thank Lorena Ramos, Research Institute Hospital Vall d'Hebron, for her technical assistance. D.M.S. is the guarantor

and he takes full responsibility for the manuscript and its originality.

Address all correspondence and requests for reprints to: David M. Selva, PhD, Diabetes and Metabolism Research Unit, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Passeig de la Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: david.martinez.selva@vhir.org.

Author contributions: C.S.-L., M.R.-G., and C.H. researched data, contributed to discussion, and reviewed/edited manuscript; and R.S. and D.M.S. researched data, contributed to discussion, wrote manuscript, and reviewed/edited manuscript.

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III Grants CP08/00058 and PI09/144 (to D.M.S.) and by Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, an initiative of Instituto de Salud Carlos III (C.S.-L., C.H., R.S., and D.M.S.). D.M.S. is the recipient of a Miguel Servet contract.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Rosner W, Aden DP, Khan MS. Hormonal influences on the secretion of steroid-binding proteins by a human hepatoma-derived cell line. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59:806–808.
- Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM, Hammond GL. Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest*. 2007;117:3979–3987.
- Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res*. 1982;38:457–510.
- de Moor P, Joossens JV. An inverse relation between body weight and the activity of the steroid binding-globulin in human plasma. *Steroidologia*. 1970;1:129–136.
- Kopelman PG, Pilkington TR, White N, Jeffcoate SL. Abnormal sex steroid secretion and binding in massively obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1980;12:363–369.
- Li C, Ford ES, Li B, Giles WH, Liu S. Association of testosterone and sex hormone-binding globulin with metabolic syndrome and insulin resistance in men. *Diabetes Care*. 2010;33:1618–1624.
- Peter A, Kantartzis K, Machann J, et al. Relationships of circulating sex hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. *Diabetes*. 2010;59:3167–3173.
- Bonnet F, Balkau B, Malécot JM, et al. Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. *Eur J Endocrinol*. 2009;161:81–85.
- 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;361:1152–1163.
- Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Matthews KA, et al. SWAN Investigators. 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;111:1242–1249.
- Karim R, Hodis HN, Stanczyk FZ, Lobo RA, Mack WJ. Relationship between serum levels of sex hormones and progression of subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:131–138.
- Sullivan PM, Petrusz P, Szpirer C, Joseph DR. Alternative processing of androgen-binding protein RNA transcripts in fetal liver. *J Biol Chem*. 1991;266:143–154.
- 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 USA*. 1987;84:339–343.
- Joseph DR. Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vit Horm*. 1994;49:197–280.
- Wilson JD. Sexual differentiation. *Annu Rev Physiol*. 1978;40:279–306.
- Bardin CW, Catterall JF. Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science*. 1981;211:1285–1294.
- vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2056–2061.
- Westphal U. *Steroid-Protein Interactions II: Monographs on Endocrinology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1986:276–301.
- French FS, Ritzén 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(1):88–95.
- 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*. 2004;24:107–122.
- Gunsalus GL, Musto NA, Bardin W. Immunoassay of androgen binding protein in blood: a new approach for study of the seminiferous tubule. *Science*. 1978;200:65–66.
- 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(6):4462–4468.
- 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;273:34105–34114.
- Selva DM, Hammond GL. Peroxisome-proliferator receptor γ represses hepatic sex hormone-binding globulin gene. *Endocrinology*. 2009;150:2183–2189.
- Selva DM, Hammond GL. Thyroid hormones act indirectly to increase sex hormone-binding globulin production by liver via hepatocyte nuclear factor-4 α . *J Mol Endocrinol*. 2009;43:19–27.
- Simó R, Saez-Lopez C, Lecube A, Hernandez C, Fort JM, Selva DM. Adiponectin upregulates SHBG production: molecular mechanisms and potential implications. *Endocrinology*. 2014;155(8):2820–2830.
- Simó R, Barbosa-Desongles A, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Potential role of tumor necrosis factor- α in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes*. 2012;61:372–382.
- Simó R, Barbosa-Desongles A, Saez-Lopez C, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Molecular mechanism of TNF α -induced down-regulation of SHBG expression. *Mol Endocrinol*. 2012;26:438–446.
- Simó R, Barbosa-Desongles A, Hernandez C, Selva DM. IL1 β down-regulation of sex hormone-binding globulin production by decreasing HNF-4 α via MEK-1/2 and JNK MAPK pathways. *Mol Endocrinol*. 2012;26:1917–1927.
- Saez-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(4):760–767.
- Jänne M, Hogeveen KN, Deol HK, Hammond GL. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. *Endocrinology*. 1999;140:4166–4174.
- Jänne M, Deol HK, Power SG, Yee S-Y, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice. *Mol Endocrinol*. 1998;12:123–136.
- Boquist L, Hellman B, Lernmark A, Täljedal IB. Influence of the mutation “diabetes” on insulin release and islet morphology in mice of different genetic backgrounds. *J Cell Biol*. 1974;62:77–89.
- Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*. 2006;87:1–16.

35. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116:1413–1419.
36. Traish AM, Feeley RJ, Guay A. Mechanisms of obesity and related pathologies: androgen deficiency and endothelial dysfunction may be the link between obesity and erectile dysfunction. *FEBS J*. 2009;276:5755–5767.
37. Traish AM, Saad F, Guay A. The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance. *J Androl*. 2009;30:23–32.
38. Corona G, Mannucci E, Ricca V, et al. The age-related decline of testosterone is associated with different specific symptoms and signs in patients with sexual dysfunction. *Int J Androl*. 2009;32:720–728.
39. Wang C, Jackson G, Jones TH, et al. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1669–1675.
40. 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;27:1036–1041.
41. 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;90:1550–1556.
42. Tchernof A, Toth MJ, Poehlman ET. Sex hormone-binding globulin levels in middle-aged premenopausal women. Associations with visceral obesity and metabolic profile. *Diabetes Care*. 1999;22:1875–1881.
43. Heald AH, Anderson SG, Ivison F, et al. Low sex hormone binding globulin is a potential marker for the metabolic syndrome in different ethnic groups. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005;113:522–528.
44. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 1978;14(3):141–148.
45. Goldstein DJ. Beneficial health effects of modest weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1992;16(6):397–415.
46. 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(1):156–162.
47. Winters SJ, Gogineni J, Karegar M, et al. Sex hormone-binding globulin gene expression and insulin resistance *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(12):E2780–E2788.
48. Rautio K, Tapanainen JS, Ruokonen A, Morin-Papunen LC. Endocrine and metabolic effects of rosiglitazone in overweight women with PCOS: a randomized placebo-controlled study. *Hum Reprod*. 2006;21:1400–1407.
49. Tarkun I, Cetinarslan B, Türemen E, Sahin T, Cantürk Z, Kom-suoglu B. Effect of rosiglitazone on insulin resistance, C-reactive protein and endothelial function in non-obese young women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2005;153:115–121.
50. Garmes HM, Tambascia MA, Zantut-Wittmann DE. Endocrine-metabolic effects of the treatment with pioglitazone in obese patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2005;21:317–323.
51. Sepilian V, Nagamani M. Effects of rosiglitazone in obese women with polycystic ovary syndrome and severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:60–65.
52. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, et al. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998;20(3):284–287.
53. Mousavinasab F, Tähtinen T, Jokelainen J, et al. The Pro12Ala polymorphism of the PPAR γ 2 gene influences sex hormone-binding globulin level and its relationship to the development of the metabolic syndrome in young Finnish men. *Endocrine*. 2006;30:185–190.
54. Allan CA, McLachlan RI. Androgens and obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17:224–232.
55. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010;16:293–311.
56. Brand JS, van der Tweel I, Grobbee DE, Emmelot-Vonk MH, van der Schouw YT. Testosterone, sex hormone-binding globulin and the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Epidemiol*. 2011;40:189–207.

CAPÍTULO II

LA ADIPONECTINA AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE SHBG HEPÁTICA: MECANISMOS MOLECULARES E IMPLICACIONES.

Existe una correlación entre los niveles plasmáticos de SHBG y de adiponectina tanto en hombres como en mujeres, produciéndose una disminución de estos niveles durante el desarrollo de la obesidad. Sin embargo, aun no se ha descrito la relación entre ambas proteínas y si existe una regulación de una por parte de la otra. En este trabajo hemos estudiado si la adiponectina regula la producción hepática de SHBG. Para ello, hemos utilizado la línea celular HepG2 como modelo *in vitro*, en la cual hemos realizado un tratamiento con adiponectina a dosis fisiológicas (25 ng/ml y 50 ng/ml) o vehículo (PBS) durante tres días. Al cabo de los tres días, tanto los niveles de expresión de SHBG como los niveles de proteína secretada al medio aumentaron con el tratamiento con adiponectina. Este aumento se produjo mediante la activación de AMPK por adiponectina, lo cual fue comprobado tratando las células HepG2 también con un activador de AMPK, AICAR, así como con un inhibidor de AMPK, *compound C*. En el caso del tratamiento con AICAR, los niveles de SHBG aumentaron mientras que cuando las células fueron tratadas con *compound C*, estos niveles disminuyeron. Sin embargo, el aumento en los niveles de SHBG fue mayor en el tratamiento con adiponectina que en el tratamiento con AICAR, por tanto, es posible que exista un mecanismo independiente de AMPK por el que la adiponectina regule positivamente la SHBG. Puesto que está descrito que la AMPK disminuye la lipogénesis hepática y aumenta la oxidación de los ácidos grasos, estudiamos el efecto del tratamiento con adiponectina sobre la enzima lipogénica ACC y sobre las enzimas lipolíticas ACOX1 y CPT-1. El tratamiento con adiponectina disminuyó los niveles de ARNm y proteína de ACC, a la vez que aumentó su fosforilación, dando lugar a un incremento de p-ACC, que inactiva la actividad de esta enzima. Además, los niveles de las enzimas lipolíticas ACOX-1 y CPT-1, tanto de expresión como de proteína, aumentaron en las células tratadas con adiponectina. Esta disminución en la lipogénesis e incremento en la β -oxidación dio lugar a una disminución en el contenido de triglicéridos hepáticos y a un aumento en los niveles de HNF-4 α . Para comprobar el papel del HNF-4 α en el aumento de SHBG por adiponectina, se silenció la expresión de este factor de transcripción mediante un ARN de interferencia (siRNA-HNF-4 α), observándose que el efecto de la adiponectina sobre la SHBG se bloqueaba. Además, la inhibición de la β -oxidación mediante etomoxir y la inducción de la lipogénesis mediante dosis elevadas de glucosa, a 30mM, bloqueó el aumento de SHBG mediado por HNF-4 α en HepG2 cotratadas con adiponectina.

Finalmente, se comprobó en plasma y biopsias hepáticas humanas la correlación entre los niveles plasmáticos de adiponectina y de SHBG y los niveles de expresión de HNF-4 α . Se observó una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de adiponectina y los niveles de expresión de HNF-4 α , así como con los niveles plasmáticos de SHBG.

Estos resultados nos permiten conocer la relación entre SHBG y adiponectina y sugieren que la adiponectina incrementa la producción hepática de SHBG activando AMPK, lo cual reduce el

RESULTADOS

contenido lipídico en el hígado e incrementa los niveles de HNF-4 α . Además, tienen posibles implicaciones clínicas: por un lado, la disminución en los niveles de adiponectina en la obesidad podría ser un mecanismo implicado en la disminución de los niveles de SHBG en este desorden; por otro lado, podría explicar también la relación entre los niveles de testosterona y los de SHBG.

Adiponectin Upregulates SHBG Production: Molecular Mechanisms and Potential Implications

Rafael Simó, Cristina Saez-Lopez, Albert Lecube, Cristina Hernandez, Jose Manuel Fort, and David M. Selva

Diabetes and Metabolism Research Unit (R.S., C.S.-L., C.H., D.M.S.), Vall d'Hebron Institut de Recerca, 08035 Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red, 28029 Madrid, Spain Endocrinology and Nutrition Unit (A.L.), Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain; Endocrine, Metabolic and Bariatric Unit (J.M.F.), General Surgery Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain

Epidemiological studies have shown that plasma SHBG levels correlate with plasma adiponectin levels, both in men and women. There are no reports describing any molecular mechanism by which adiponectin regulates hepatic SHBG production. The aim of the present study is to explore whether adiponectin regulates SHBG production by increasing HNF-4 α levels through reducing hepatic lipid content. For this purpose, *in vitro* studies using human HepG2 cells, as well as human liver biopsies, were performed. Our results show that adiponectin treatment increased SHBG production via AMPK activation in HepG2 cells. Adiponectin treatment decreased the mRNA and protein levels of enzymes related to hepatic lipogenesis (ACC) and increased those related to fatty acid oxidation (ACOX and CPTI). These adiponectin-induced changes in hepatic enzymes resulted in a reduction of total TG and FFA and an increase of HNF-4 α . When HNF-4 α expression was silenced by using siRNA, adiponectin-induced SHBG overexpression was blocked. Furthermore, adiponectin-induced upregulation of SHBG production via HNF-4 α overexpression was abrogated by the inhibition of fatty acid oxidation or by the induction of lipogenesis with a 30mM glucose treatment in HepG2 cells. Finally, adiponectin levels correlated positively and significantly with both HNF-4 α and SHBG mRNA levels in human liver biopsies. Our results suggest for the first time that adiponectin increases SHBG production by activating AMPK, which reduces hepatic lipid content and increases HNF-4 α levels. (*Endocrinology* 155: 2820–2830, 2014)

Sex hormone-binding globulin (SHBG) modulates the bioavailability of sex steroids in blood and hormone-target tissues (1). Genetic, hormonal and lifestyle-related factors determine SHBG levels. Low SHBG levels are a risk factor for developing metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases (2–6).

Body mass index (BMI) is considered a major determinant of SHBG plasma concentrations (7, 8). Obese individuals of all ages have low plasma SHBG levels (7, 8) whereas high serum SHBG levels are present in children (9) and women (10) with anorexia nervosa. Recent evidence suggests that elevated plasma levels of proinflammatory cytokines rather than insulin account for the low plasma

SHBG levels in obese subjects (11, 12). In this regard, we have shown clear evidence that elevated plasma levels of tumor necrosis factor alpha (TNF α) or interleukin 1 β (IL1 β) are factors downregulating SHBG production (11–13).

Orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF-4 α) is a highly conserved member of the nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors. It is known as a master regulator of liver-specific gene expression (14). It has been reported that HNF-4 α has a ligand-binding pocket that binds fatty acyl Coenzyme A thioesters and linoleic (15, 16). Previous studies have described HNF-4 α as the major transcription factor regu-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2014 by the Endocrine Society

Received January 27, 2014. Accepted May 2, 2014.

First Published Online May 14, 2014

Abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACOX, acyl-coenzyme A oxidase; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; BMI, body mass index; CPT-I, carnitine palmitoyl transferase-I; SHBG, sex hormone-binding globulin.

lating hepatic *SHBG* gene expression (17). In addition, we have previously reported that *SHBG* gene expression is downregulated by an increase in de novo lipogenesis induced by high carbohydrate diets that reduce HNF-4 α levels (18). On the other hand, thyroid hormones increase *SHBG* gene expression by increasing hepatic HNF-4 α levels and this effect is abrogated by inhibiting β -oxidation (19). Therefore, depending on the metabolic status of the liver *SHBG* production can be modulated by inducing or inhibiting lipogenesis or β -oxidation. This means that activation of lipogenesis or inhibition of β -oxidation will decrease hepatic *SHBG* production and, by contrast, inhibition of lipogenesis or activation of β -oxidation will increase *SHBG* production.

As occurs with *SHBG*, it is well established that adiponectin plasma levels are negatively correlated with BMI and low plasma adiponectin levels are found in obese patients (20, 21). Adiponectin is a 244-amino acid protein secreted predominantly by white adipose tissue (22). Two different adiponectin receptors have been described in the literature: AdipoR1 that is expressed ubiquitously but abundantly in skeletal muscle and endothelial cells; and AdipoR2 that is predominantly expressed in the liver (23). Adiponectin receptors have been shown to mediate direct effects on liver and muscle insulin sensitivity (24). Most of the adiponectin actions in the liver have been attributed to the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (25). The AMPK serves as an essential cellular monitor of energy charge; an elevated AMP/ATP ratio activates the kinase and results in a decrease in anabolic and an increase in catabolic pathways (26). Once activated, AMPK phosphorylates target proteins such as acetyl-CoA carboxylase (ACC) and CREB-regulated transcription coactivator in order to restore the energy status through different mechanisms including increased fatty acid oxidation and decreased hepatic lipogenesis (25–28).

Several epidemiological studies have reported a positive relationship between adiponectin and *SHBG* plasma levels (29, 30), and both have shown a negative correlation with BMI (7, 8, 20, 21). The downregulation of adiponectin levels that occurs in obese patients seems to participate in the development of fatty liver disease that is associated with low *SHBG* levels. On this basis we wanted to test the hypothesis that adiponectin could play a role in regulating hepatic *SHBG* production. To shed light on this issue, we have explored whether adiponectin regulates *SHBG* production by increasing HNF-4 α levels through reducing hepatic lipid content.

Materials and Methods

Cell culture experiments

Cell culture reagents were from Life Technologies Inc (Invitrogen SA). HepG2 hepatoblastoma cells (catalog no. HB-8065;

ATCC) were maintained in DMEM (5 mmol/L glucose) supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 U penicillin/ml and 100 μ g streptomycin/ml). For experiments, HepG2 cells were cultured to 50–70% confluence prior to the addition of vehicle (PBS or DMSO), adiponectin (Servicios Hospitalarios), compound C (Merck Millipore), glucose (10, 20 or 30 mM), etomoxir (Sigma-Aldrich SL), or AICAR (Sigma-Aldrich SL). All experiments were performed at least twice in triplicate.

The siRNA experiments were carried out using HiPerfect Transfection Reagent together with either a control siRNA (catalog 1022076) or a HNF-4 α siRNA (catalog 00161546) obtained from QIAGEN (IZASA). Three days after transfection media was collected for *SHBG* measurements and cells were harvested for RNA and protein analysis.

Transient transfections of human *SHBG* promoter-driven luciferase reporter plasmids together with a pCMRenilla control plasmid were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen SA) in HepG2 cells treated previously for 3 days with vehicle (PBS) or adiponectin (50 ng/ml). Two days after transfection, luciferase and renilla activity were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

SHBG measurements

Human *SHBG* levels from human samples and media from HepG2 cells were measured using an ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH).

RNA analysis

Total RNA was extracted from HepG2 cells and human liver biopsies using TRIzol reagent (Invitrogen SA). Reverse transcription was performed at 42°C for 50 minutes, using 3 μ g of total RNA and 200 U of Superscript II together with an oligo-dT primer and reagents provided by Invitrogen. An aliquot of the reverse transcription product was amplified in a 25- μ l reaction real time PCR using SYBRGreen (Invitrogen SA) with appropriate oligonucleotide primer pairs corresponding to human HNF-4 α , *SHBG*, ACC, ACOX1a, ACOX1b, CPT-1, and 18S (Supplemental Table 1). Results were analyzed using the 7000 SDS program.

Western blot analysis

After treatments, HepG2 cells were homogenized in RIPA buffer with Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Protein extracts were used for Western blotting with antibodies against human HNF-4 α (C-19; sc-6556), CPT-I (A-14; sc-31128), and ACOX (H-140; sc-98499) (Santa Cruz Biotechnology Inc), ACC (ab45174) (Abcam) and P-ACC (#3661) (Cell Signaling Technology Inc), and human PPIA (BIOMOL Int). Specific antibody-antigen complexes were identified using an HRP-labeled goat antirabbit IgG, rabbit antimouse IgG, or rabbit antigoat IgG and chemiluminescent substrates (Pierce Biotechnology Inc) by exposure to x-ray film.

Lipid measurements

Total triglycerides and free fatty acid content from HepG2 cells were measured using a triglyceride assay kit (Cat.#K622-100 BioVision) and a free fatty acid kit (Cat.#K612-100 BioVision) following the manufacturer's instructions.

Human Samples

We recruited 15 obese male subjects [BMI median 42.27 kg/m² (range 32.61–52.31 kg/m²)] of Caucasian origin who un-

derwent bariatric surgery at the University Hospital Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). The exclusion criteria were: 1) Elevated transaminases. We defined normal transaminases as values within the 95th percentile of healthy subjects (AST: 12–40 UI/l and ALT: 8–44 UI/l); 2) Hepatitis C virus infection. For this purpose all patients with positive anti-hepatitis c virus antibodies were excluded; and 3) Presence of diabetes. This was defined on the basis of a history of therapy with oral hypoglycemic agents, GLP1 analogues or insulin at the time of inclusion. In all patients not previously diagnosed, the criteria recommended by the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes were used (31).

Blood samples were collected before surgery from the antecubital vein, plasma was separated immediately by centrifugation, and aliquots were frozen at –80°C for subsequent analysis. Liver biopsies were obtained using a fine needle. All biopsies were at least 2 cm in length and contained at least eight portal tracts. Samples were frozen at –80°C for subsequent analysis.

Informed written consent was obtained from all participants, and the study was approved by the human ethics committee from the Hospital Vall d'Hebron.

Statistical analyses

Normal distribution of the variables was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparison of quantitative variables was performed by either the Student's *t* test or Mann-Whitney test according to the data distribution. All data are presented as means ± standard deviation. Spearman's correlation coefficients were used to establish the association between SHBG levels and the other parameters. For graphics a linear regression test was applied. In addition, a multiple regression analysis was performed (dependent variable: SHBG; independent variables: adiponectin and BMI). Significance was accepted at the level of *P* < .05. Statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (SPSS Inc).

Results

Adiponectin increases SHBG production through AMPK activation in HepG2 cells

We first examined the effects of daily supplementation of two doses

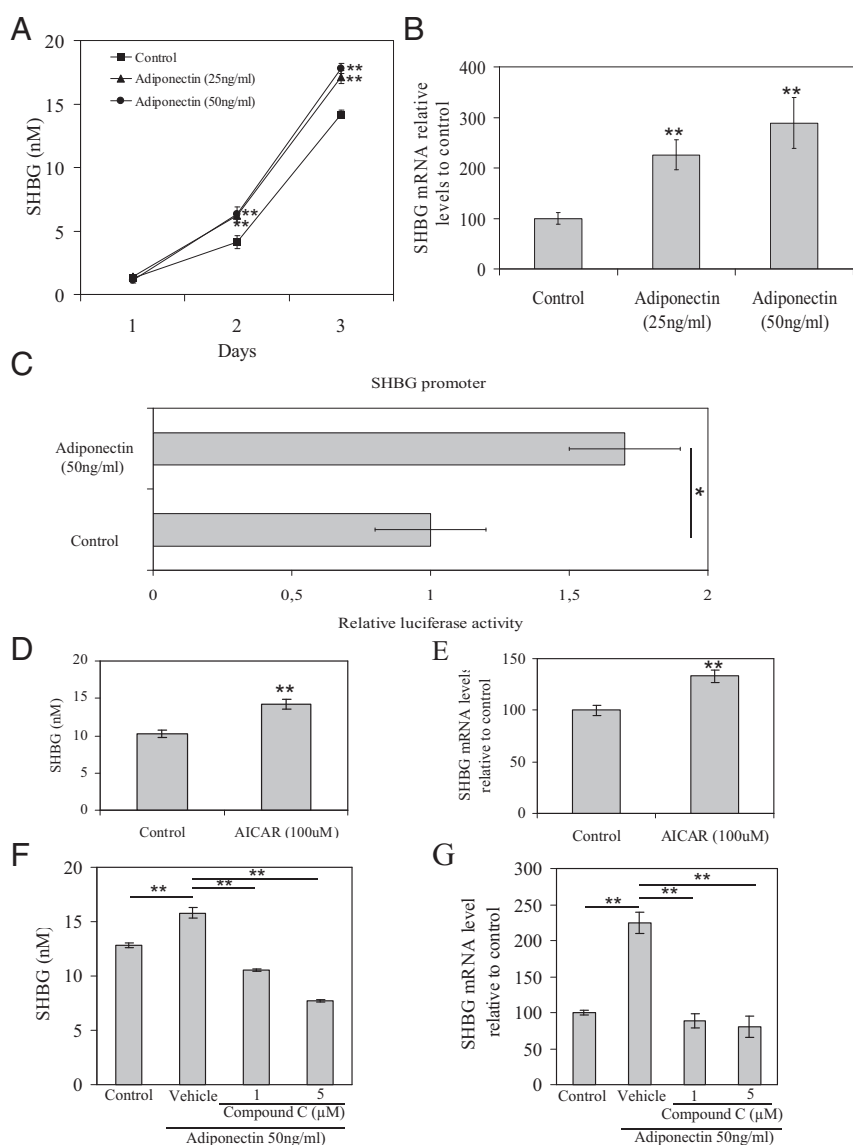


Figure 1. Daily treatment with adiponectin increases SHBG production via AMPK over 3 days in HepG2 cells. A, SHBG accumulation in the medium was measured using an ELISA in HepG2 cells treated daily with vehicle or 2 concentrations of adiponectin (25 and 50 ng/ml) for 3 days. Data points are mean ± SD of triplicate measurements. **, *P* < .01 when compared with the control. B, Analysis of SHBG mRNA levels in HepG2 cells treated as in (A). Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean ± SD of triplicates. **, *P* < .01 when compared with the control. C, Adiponectin (50 ng/ml) treated HepG2 cells over 3 days showed increased SHBG promoter activity in Luciferase reporter gene assays when compared with vehicle treated cells. Data points are mean ± SD of triplicate measurements. *, *P* < .05 when compared with the control. D, SHBG accumulation in the medium was measured using an ELISA in HepG2 cells treated daily with vehicle or AICAR (100 μM) for 3 days. Data points are mean ± SD of triplicate measurements. **, *P* < .01 when compared with the control. E, Analysis of SHBG mRNA levels in HepG2 cells treated as in (D). Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean ± SD of triplicates. **, *P* < .01 when compared with the control. F, SHBG accumulation in the medium was measured using an ELISA in HepG2 cells treated daily with vehicle, adiponectin (50 ng/ml) alone or in the presence of compound C (1 μM or 5 μM) over the course of 3 days. Data points are mean ± SD of triplicate measurements. **, *P* < .01 when compared with the control. G, Analysis of SHBG mRNA levels in HepG2 cells treated as in (F). Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean ± SD of triplicates. **, *P* < .01 when compared with the control.

of adiponectin (25 or 50 ng/ml) on SHBG production by HepG2 cells over the course of 3 days by comparing medium SHBG concentrations on days 1 and 3 of HepG2

cells treated with vehicle and 25 or 50 ng/ml of adiponectin. Adiponectin treatment increased SHBG protein levels (Figure 1A) and SHBG mRNA levels (Figure 1B) when compared with the vehicle treated HepG2 cells.

To determine if adiponectin treatment was increasing the transcriptional activity of the *SHBG* gene we next performed luciferase reporter gene assays using the proximal *SHBG* promoter in HepG2 cells in the presence or absence of adiponectin (50 ng/ml). The results showed that adiponectin treatment increased SHBG transcriptional activity when compared with control treated HepG2 cells (Figure 1C).

In order to explore whether adiponectin induced increase of SHBG production was mediated by AMPK activation, we next treated HepG2 cells with AICAR (100 μ M), a well-known AMPK activator (32). We also treated HepG2 cells with compound C (1 and 5 μ M), an AMPK inhibitor in the presence or absence of adiponectin (50 ng/ml), over the course of 3 days. The results showed that AICAR treatment increased SHBG protein levels (Figure 1D) and SHBG mRNA levels (Figure 1E) when compared with the vehicle treated HepG2 cells. The compound C cotreatment was able to block the adiponectin-induced increase of SHBG protein levels (Figure 1F) and SHBG mRNA levels (Figure 1G).

Adiponectin treatment reduces hepatic triglyceride and free fatty acid by inhibiting lipogenesis and inducing fatty acid oxidation that results in an increase of HNF-4 α in HepG2 cells

The hepatic effects of adiponectin in the liver are well described in the literature and it is well known that adiponectin reduces lipogenesis and increases fatty acid oxidation in the liver (24, 33). To explore if this was the case in our HepG2 cell cultures,

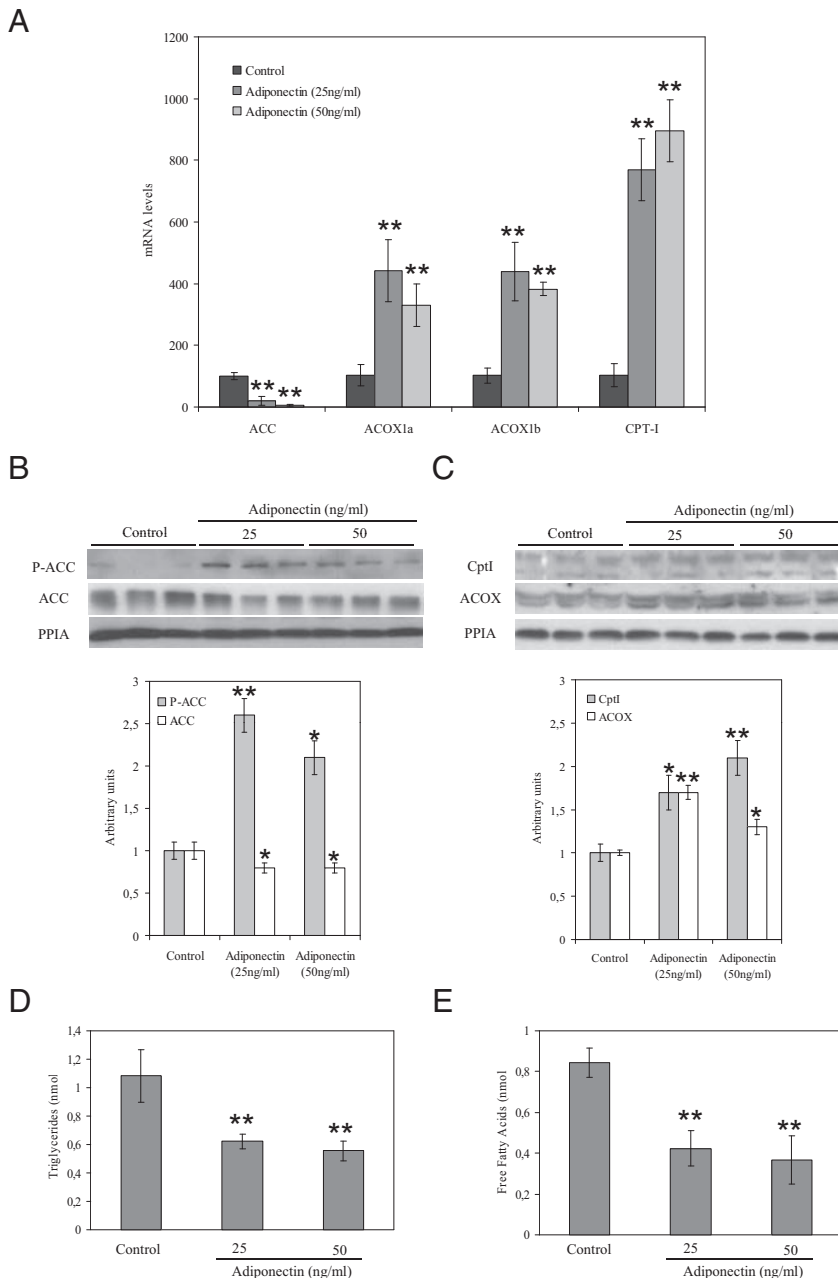


Figure 2. Adiponectin reduces lipogenesis and increases fatty acid oxidation in HepG2 cells. A, Analysis of ACC, ACOX1, ACOX2, and CPT-1 mRNA levels in HepG2 cells treated daily with vehicle and two concentrations of adiponectin (25 and 50 ng/ml) for 3 days. Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. **, $P < .01$ when compared with the control. B, Western blot of ACC, phospho-ACC, and PPIA in total protein extracts from HepG2 cells treated as in (A). Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. *, $P < .05$ and **, $P < .01$ when compared with the control. C, Western blot of ACOX, CPT-1, and PPIA in total protein extracts from HepG2 cells treated as in (A). Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. *, $P < .05$ and **, $P < .01$ when compared with the control. D, Triglyceride content in HepG2 cells treated as in (A). Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. **, $P < .01$ when compared with the control. E, Free fatty acid content in HepG2 cells treated as in (A). Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. **, $P < .01$ when compared with the control.

we analyzed the mRNA levels of ACC as a lipogenic enzyme and peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase (ACOX) and carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) as fatty acid oxidation enzymes after 3 days of treatment with adiponectin (25 or 50 ng/ml). Our results showed that adiponectin treatment reduced mRNA levels of ACC and increased mRNA levels of ACOX1a, ACOX1b, and CPT-I

when compared with vehicle treated HepG2 cells (Figure 2A). Moreover, a decrease in total ACC protein levels and an increase in ACC phosphorylation were detected after adiponectin treatment when compared with vehicle treated HepG2 cells (Figure 2B). In addition, an increase in ACOX and CPT-I protein levels was detected in adiponectin treated HepG2 cells when compared with vehicle treated cells (Figure 2C).

We next explored whether this adiponectin-induced reduction in lipogenesis and increase in lipolysis would reduce the lipid content of HepG2 cells. We therefore measured total triglycerides and total free fatty acids in control and adiponectin (25 or 50 ng/ml) HepG2 cells. Our results showed that adiponectin treated cells had less triglyceride and free fatty acids than untreated HepG2 cells (Figure 2, D and E).

Given that HNF-4 α plays a key role in the transcriptional activity of the human *SHBG* promoter (17) and we have previously shown that HNF-4 α protein levels are altered by changes in hepatic lipid content induced by increasing lipogenesis (18) or β -oxidation (19), we examined HNF-4 α levels in HepG2 cells after a 3-day treatment with vehicle or adiponectin (25 or 50 ng/ml). These treatments showed that cells treated with adiponectin had increased HNF-4 α mRNA levels (Figure 3A) and protein levels (Figure 3B) when compared with vehicle treated cells. Furthermore, AICAR treatment was also able to increase HNF-4 α mRNA and protein levels when compared with vehicle treated cells (Figure 3, C and D). Moreover, compound C cotreatment was able to block the adiponectin induced increase of HNF-4 α mRNA levels (Figure 3E) and protein levels (Figure 3F).

Adiponectin-induced increase of SHBG production is blocked by siRNA treatment against HNF-4 α in HepG2 cells

We next used a siRNA against HNF-4 α in order to explore if we

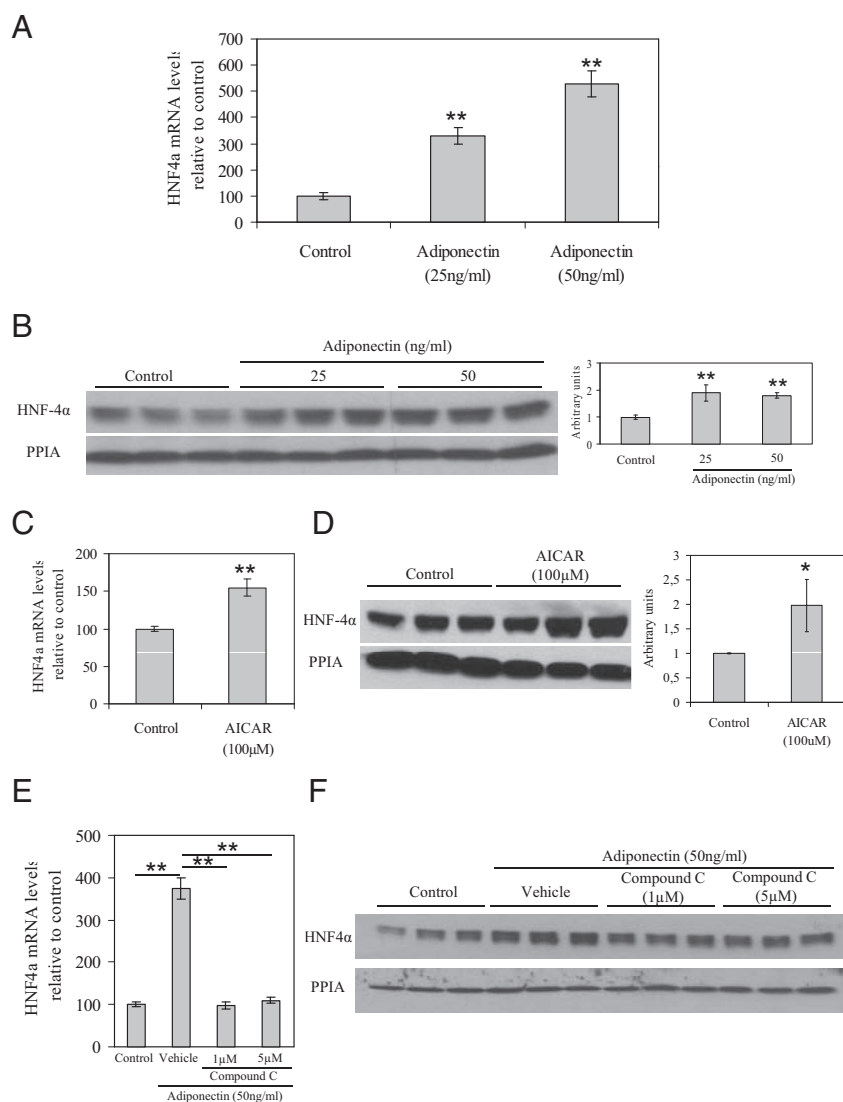


Figure 3. Daily adiponectin treatment increases SHBG production via HNF-4 α levels in HepG2 cells. A, Analysis of HNF-4 α mRNA levels in HepG2 cells treated daily with vehicle or two concentrations of adiponectin (25 and 50 ng/ml) for 3 days. Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. **, $P < .01$ when compared with the control. B, Western blot of HNF-4 α and PPIA in total protein extracts from HepG2 cells treated as in (A). C, Analysis of HNF-4 α mRNA levels in HepG2 cells treated daily with vehicle or AICAR (100 μ M) for 3 days. Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. **, $P < .01$ when compared with the control. D, Western blot of HNF-4 α and PPIA in total protein extracts from HepG2 cells treated as in (C). Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. *, $P < .05$ when compared with the control. E, Analysis of HNF-4 α mRNA levels in HepG2 cells treated daily with vehicle, adiponectin (50 ng/ml) alone, or in the presence of compound C (1 μ M or 5 μ M) over the course of 3 days. Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. ** $P < .01$ when compared with the control. F, Western blot of HNF-4 α and PPIA in total protein extracts from HepG2 cells treated as in E.

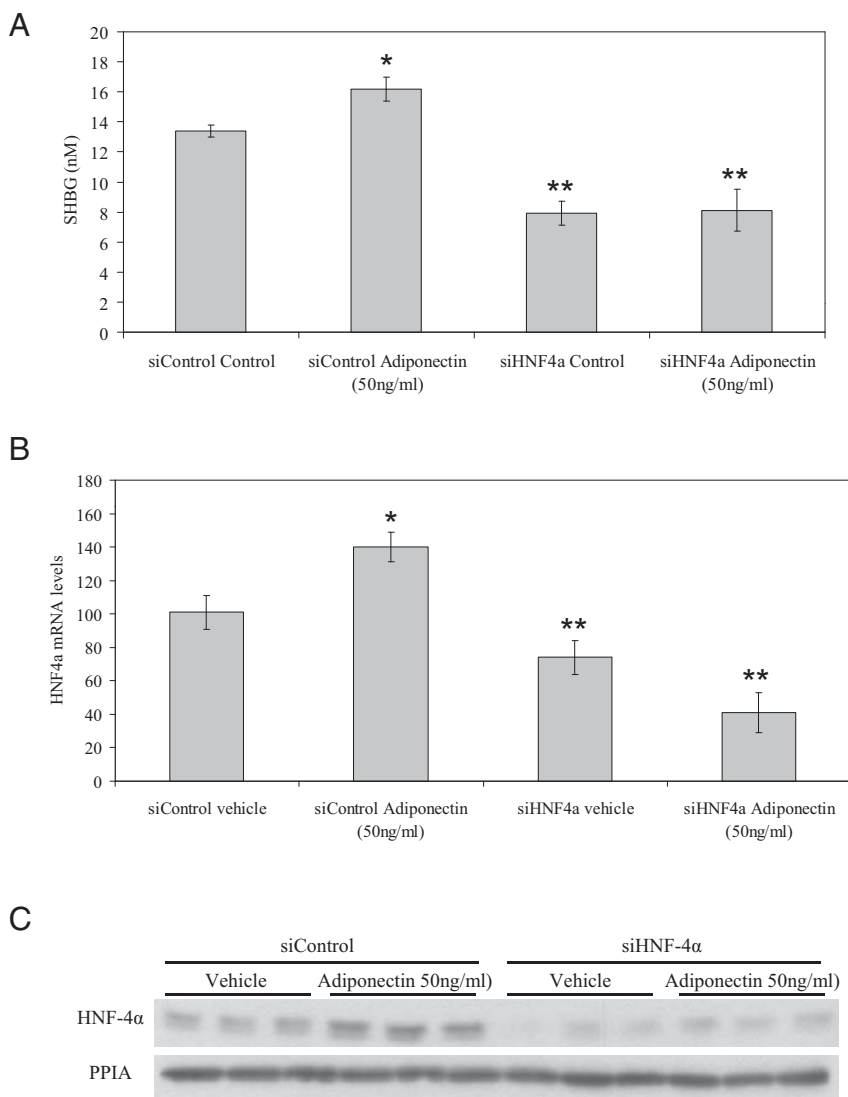


Figure 4. Daily adiponectin treatment increases SHBG production via HNF-4 α levels in HepG2 cells. A, SHBG accumulation in the medium was measured using an ELISA in HepG2 cells treated daily with vehicle or adiponectin (50 ng/ml) in the presence of control siRNA or HNF-4 α siRNA for 3 days. Data points are mean \pm SD of triplicate measurements. *, $P < .05$ and **, $P < .01$ when compared with the control. B, Analysis of HNF-4 α mRNA levels in HepG2 cells treated as in (A). Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. *, $P < .05$ and **, $P < .01$ when compared with the control. C, Western blot of HNF-4 α and PPIA in total protein extracts from HepG2 cells treated as in A.

could block the increase in SHBG production caused by adiponectin. The results showed that in HepG2 cells treated with siRNA control adiponectin was able to increase SHBG production when compared with the vehicle treated HepG2 cells (Figure 4A). However, when HepG2 cells were treated with siRNA against HNF-4 α the adiponectin-induced increase in SHBG production was lost (Figure 4A). Moreover, HNF-4 α mRNA and protein were increased by adiponectin treatment in siRNA control HepG2 cells when compared with vehicle treated cells (Figure 4, B and C). This effect on HNF-4 α mRNA

and protein was abrogated by HNF-4 α siRNA treatment (Figure 4, B and C).

Adiponectin-induced increased SHBG production is blocked by inducing lipogenesis or blocking fatty acid oxidation in HepG2 cells

We next explored whether increasing lipogenesis or blocking fatty acid oxidation would abrogate the effects of adiponectin on SHBG production. For this purpose, we treated HepG2 cells with adiponectin alone or in the presence of glucose (30 mM), which, as we have previously shown, increases lipogenesis (18) or etomoxir (10 μ M), a fatty acid oxidation inhibitor (19), over the course of 3 days. As previously reported (19) our results showed that whereas treatment of etomoxir alone did not alter SHBG production, the 30 mM glucose treatment significantly reduced SHBG production by reducing HNF-4 α mRNA and protein levels in HepG2 cells (Supplemental Figure 1). However, when cells were treated with glucose (30 mM) or etomoxir (10 μ M) in the presence of adiponectin (50 ng/ml) both cotreatments were able to block the adiponectin-induced increase of mRNA and protein levels of both HNF-4 α and SHBG in HepG2 cells (Figure 5). Interestingly, lower glucose concentrations (10 mM or 20 mM) were also able to block the adi-

ponectin-induced increase of SHBG mRNA and protein in HepG2 cells (Supplemental Figure 2).

Plasma adiponectin levels correlate with hepatic HNF-4 α mRNA levels that in turn correlate with SHBG mRNA levels in human subjects

A positive and significant correlation ($r = 0.612$, $P = .015$) between plasma levels of SHBG and adiponectin was found (Figure 6A). In addition we found that plasma adiponectin levels correlated with liver HNF-4 α mRNA levels ($r = 0.539$, $P < .038$) (Figure 6B). More-

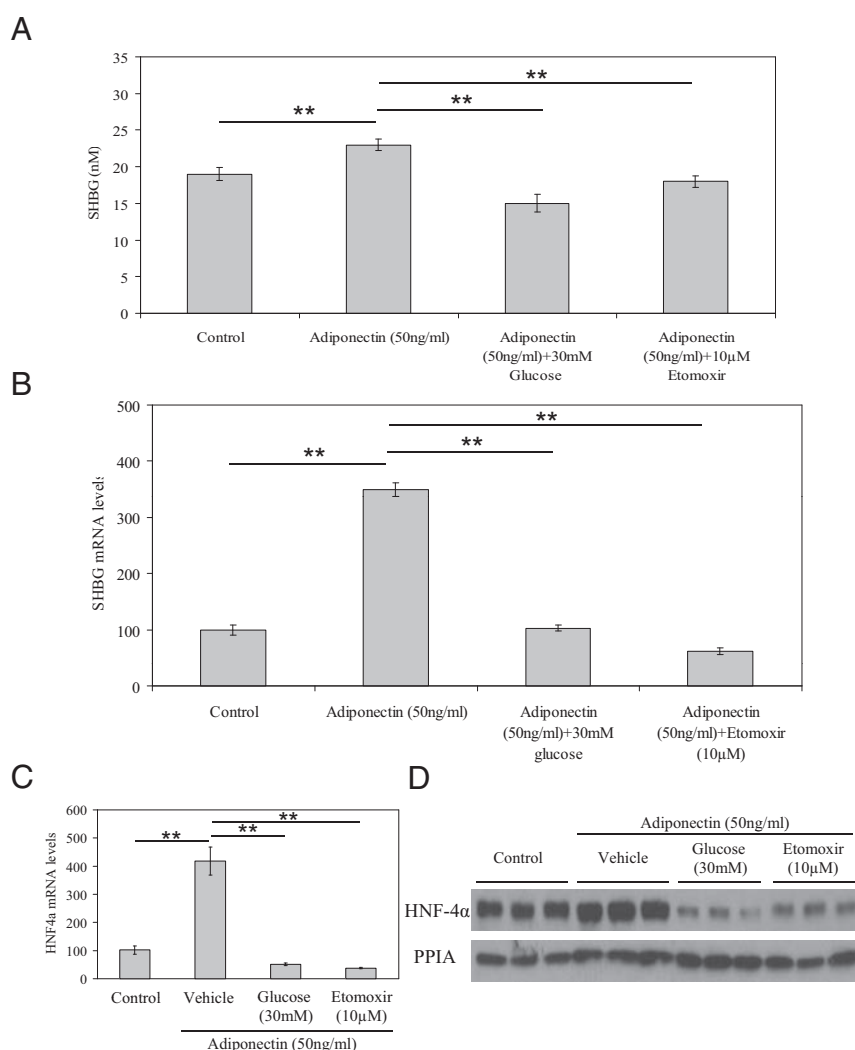


Figure 5. Adiponectin-induced increase in SHBG production could be blocked by increasing lipogenesis or inhibiting fatty acid oxidation. A, SHBG accumulation in the medium was measured using an ELISA in HepG2 cells treated daily with vehicle, adiponectin (50 ng/ml) alone, or in the presence of glucose (30 mM) or etomoxir (10 μ M) over the course of 3 days. Data points are mean \pm SD of triplicate measurements. **, $P < .01$ compared with the control. B, Analysis of SHBG mRNA levels in HepG2 cells treated as in (A). Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. **, $P < .01$ compared with the control. C, Analysis of HNF-4 α mRNA levels in HepG2 cells treated as in (A). Human 18S (h18S) mRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. **, $P < .01$ compared with the control. D, Western blot of HNF-4 α and PPIA in total protein extracts from HepG2 cells treated as in (A).

over, we found a significant correlation between hepatic SHBG mRNA and HNF-4 α mRNA levels ($r = 0.624$; $P < .013$) (Figure 6C).

Finally, in the multiple regression analysis we observed that adiponectin plasma levels were independently related to circulating SHBG ($P = .045$).

Discussion

Epidemiological evidence shows a positive relationship between adiponectin and SHBG plasma levels (29, 30). It

is also well known that both adiponectin and SHBG plasma levels show a negative correlation with the BMI (7, 8, 20, 21). However, it is unknown whether the correlation between adiponectin and SHBG is merely a surrogate mediated by the BMI or, by contrast, there are underlying molecular mechanisms that could explain this relationship. In this study, the hypothesis that adiponectin regulates hepatic SHBG production has been tested. We provide evidence that adiponectin, at physiological doses, increases SHBG production through HNF-4 α up-regulation in HepG2 cells. This effect is mediated by AMPK and the consequent reduction in lipid hepatic content caused by the inhibition of lipogenesis and the activation of β -oxidation. However, it should be noted that whereas the effect of adiponectin in increasing the protein levels of SHBG and HNF-4 α protein was very similar to the observed by AICAR, we detected differences at transcriptional level, the adiponectin effect being more potent than the AICAR. These results may suggest that adiponectin SHBG induction was partially exerted through an AMPK independent pathway.

Adiponectin is secreted predominantly by the white adipose tissue (22) modulating a number of metabolic processes, including glucose regulation and fatty acid oxidation (34). In the liver, adiponectin exerts its actions through AdipoR2 which activates the AMPK signaling pathway that results in the decrease of de novo lipogenesis by the phosphorylation of ACC (23, 33). On the other hand, adiponectin also upregulates CPT-I expression levels that in turn increases hepatic fatty acid oxidation (33). These adiponectin actions result in the reduction of the hepatic lipid content (33). Moreover, genetic variations in the *AdipoR2* gene are associated with liver fat content (35) and *AdipoR2* mRNA expression is significantly reduced in liver biopsies of patients with NASH (36). In our in vitro studies we found that HepG2 cells treated with adiponectin showed a reduction in ACC mRNA and protein levels

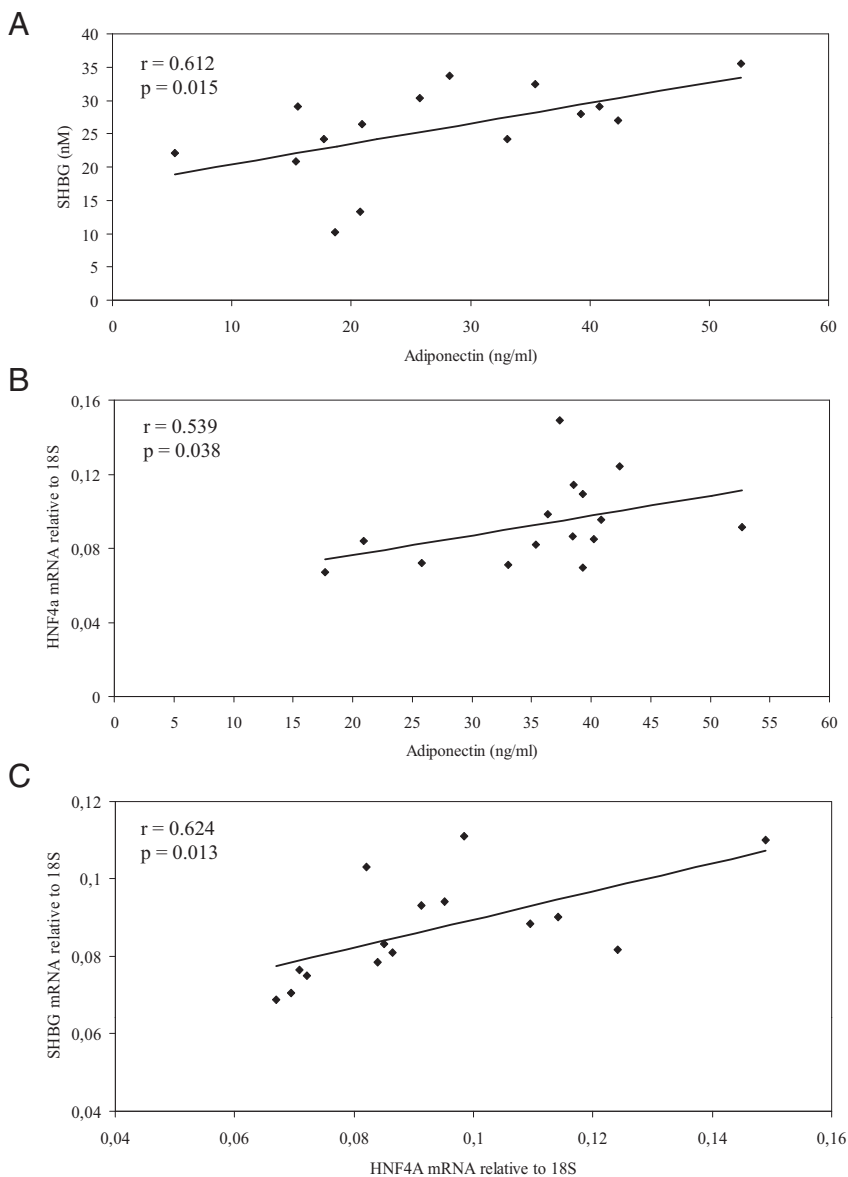


Figure 6. Correlations between SHBG, adiponectin and HNF-4 α in human plasma and liver biopsies. Positive correlation between plasma SHBG and adiponectin (A), plasma adiponectin and hepatic HNF-4 α mRNA levels (B), and hepatic SHBG and HNF-4 α mRNA levels (C).

and an increase in ACOX and CPT1 mRNA and protein levels when compared with vehicle treated HepG2 cells. Importantly, adiponectin treatment reduced hepatic total triglyceride and free fatty acid content in HepG2 cells. These findings confirm the results of previous studies (33, 37) and provide molecular evidence supporting the results of a large multiethnic population-based cohort showing that adiponectin levels were inversely associated with hepatic steatosis, even after controlling for measures of insulin sensitivity, extrahepatic abdominal adiposity, and ethnicity (38).

It has been previously reported by Peter et al (39) that liver fat, but not visceral fat or total body fat was an independent predictor of plasma SHBG levels. Moreover,

after a dietary intervention the increase in plasma SHBG levels was strongly associated with a decrease in liver fat (40). These findings are in accordance with our previous studies using HepG2 cells and the human *SHBG* transgenic mice that showed the molecular mechanisms by which a reduction or accumulation of hepatic lipids was able to regulate SHBG production (18, 19). In this regard, we showed that SHBG production was reduced by exogenous palmitate or endogenous palmitate accumulation from de novo lipogenesis induced by high carbohydrate diets (18). In these studies we also showed that hepatic palmitate accumulation was able to reduce HNF-4 α levels (18). In contrast, we also demonstrated that thyroid hormones increased SHBG production by inducing fatty acid oxidation that was able to reduce hepatic lipid content. This reduction was able to increase hepatic HNF-4 α levels (19). With this evidence we hypothesized that the mechanism by which adiponectin regulates hepatic SHBG production is based on the changes in HNF-4 α due to the alterations in hepatic lipid turnover. Our results support this hypothesis since HepG2 cells treated with adiponectin increased *SHBG* promoter activity due to the inhibition of lipogenesis and the activation of β -oxidation.

The relationship between adiponectin and HNF-4 α has been analyzed previously. A study performed with primary cultures of human hepatocytes found that adiponectin treatment was able to reduce HNF-4 α levels (41). These results do not agree with our results. However, several aspects of the experimental design distinguish our work from this previous study. First, they performed a 24-hour treatment whereas our studies were performed over the course of three days. Second, our studies were performed in the presence of serum in the culture media, whereas they used serum free media. Third and most important, they used an adiponectin dose of 10 μ g/ml that is a nonphysiological concentration and 200 times higher than the adiponectin dose (50 ng/ml) used in our study. In addition, the results obtained by Liu et al (42)

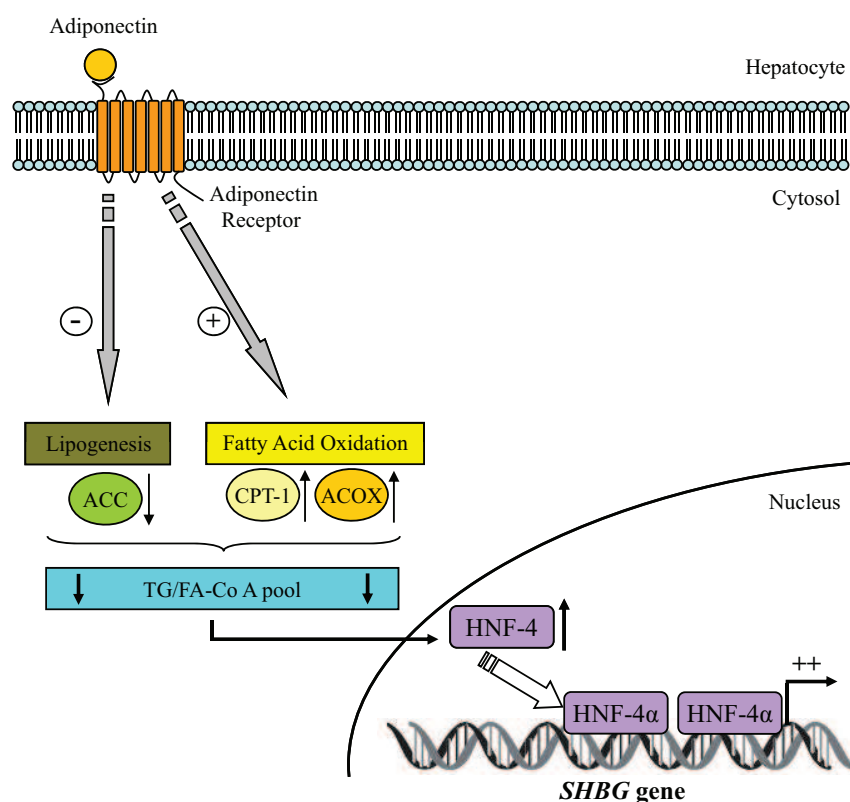


Figure 7. Mechanism by which adiponectin regulates hepatic SHBG production. Among others, adiponectin effects on the liver consist in reducing lipogenesis and increasing fatty acid oxidation. This will cause a reduction in the hepatic fatty acid pool increasing HNF-4 α levels that in turn increase SHBG production.

after generating the adiponectin KO mouse are in agreement with our results. These studies reveal that the hepatic HNF-4 α levels in adiponectin KO mice were reduced when compared with wild-type mice.

To further confirm our results we demonstrated that both treatment with specific siRNA against HNF-4 α or the induction of lipid accumulation were able to block the adiponectin-induced increase in SHBG production in HepG2 cells. Furthermore, we have also found a significant correlation between plasma adiponectin levels and hepatic HNF-4 α mRNA levels, as well as between SHBG and HNF-4 α mRNA levels in liver biopsies from obese patients, that suggest the molecular mechanisms detected in our in vitro studies could also be present in humans. A scheme illustrating the metabolic pathway by which adiponectin regulates hepatic SHBG production is displayed in figure 7.

Our findings have potential clinical implications. First, adiponectin could be a link between hepatic steatosis and low circulating SHBG levels. However, specific studies addressed to confirm this issue are needed. Because low SHBG has been reported as an independent cardiovascular risk factor, the relationship between adiponectin, fatty liver disease, and SHBG would also deserve future inves-

tigation. Second, adiponectin could be contemplated as a new mechanism involved in SHBG regulation in the setting of obesity. In this regard, previous reports have suggested that other signals from the adipose tissue independently of adiponectin and leptin could regulate SHBG production by the liver (43). We have also reported that the proinflammatory cytokines TNF α and IL1 β , which are elevated in obese patients, induce a downregulation of hepatic SHBG production. In view of our results, the low adiponectin levels reported in obesity could be added to the mechanisms involved in the obesity-induced downregulation of SHBG and total testosterone levels. In addition, it is possible that therapeutic strategies addressed to upregulating adiponectin could be useful in increasing SHBG and testosterone levels. Further studies to confirm this hypothesis seem warranted. Finally, our findings could contribute to explaining the higher plasma levels of SHBG that women present in com-

parison with men. It has been postulated that testosterone inhibits hepatic SHBG production but to the best of our knowledge no molecular mechanism has ever been suggested. Moreover, androgen response elements have not been found in the human SHBG promoter. Nishizawa et al (44) have recently demonstrated in vivo and in vitro that treatment with testosterone in mice is accompanied by a reduction in plasma adiponectin and, that in cultured adipocytes, testosterone reduces adiponectin secretion (44). Therefore, it is possible that testosterone could regulate indirectly hepatic SHBG production by reducing adiponectin levels. Because women have higher plasma adiponectin levels than men (45), this could be an explanation of why women have higher plasma SHBG levels than men.

In conclusion, adiponectin increases hepatic production of SHBG by upregulating HNF-4 α levels via changes in the hepatic lipid content. These results suggest a new molecular mechanism by which adiponectin regulates SHBG production and they could have significant clinical implications.

Acknowledgments

We thank Lorena Ramos, Research Institute Hospital Vall d'Hebron, for her technical assistance.

Address all correspondence and requests for reprints to: David M. Selva, PhD, Diabetes and Metabolism Research Unit, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: david.martinez.selva@vhir.org.

This work was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (PI12/01357 to D.M.S.) and Centro de Investigación Biomédica en Red, an initiative of Instituto de Salud Carlos III (R.S., C.S.L., A.L., F.J.M., V.R., C.H. and D.M.S.). D.M.S. is the recipient of a Miguel Servet contract.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res.* 1982;38:457–510.
2. Li C, Ford ES, Li B, Giles WH, Liu S. Association of testosterone and sex hormone-binding globulin with metabolic syndrome and insulin resistance in men. *Diabetes Care.* 2010;33:1618–1624.
3. 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;361:1152–1163.
4. Bonnet F, Balkau B, Malécot JM, et al. DESIR Study Group. Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. *Eur J Endocrinol.* 2009;161:81–85.
5. Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Matthews KA, et al. SWAN Investigators. 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;111:1242–1249.
6. Karim R, Hodis HN, Stanczyk FZ, Lobo RA, Mack WJ. Relationship between serum levels of sex hormones and progression of subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:131–138.
7. de Moor P, Joossens JV. An inverse relation between body weight and the activity of the steroid binding-globulin in human plasma. *Steroidologia.* 1970;1:129–136.
8. Kopelman PG, Pilkington TR, White N, Jeffcoate SL. Abnormal sex steroid secretion and binding in massively obese women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1980;12:363–369.
9. Pascal N, Amouzou EK, Sanni A, Namour F, Abdelmoutaleb I, Vidailhet M, Guéant JL. Serum concentrations of sex hormone binding globulin are elevated in kwashiorkor and anorexia nervosa but not in marasmus. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:239–244.
10. Barbe P, Bennet A, Stebenet M, Perret B, Louvet JP. Sex-hormone-binding globulin and protein-energy malnutrition indexes as indicators of nutritional status in women with anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:319–322.
11. Simó R, Barbosa-Desongles A, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Potential role of tumor necrosis factor- α in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes.* 2012;61:372–382.
12. Simó R, Barbosa-Desongles A, Sáez-Lopez C, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Molecular mechanism of TNF α -induced down-regulation of SHBG expression. *Mol Endocrinol.* 2012;26:438–446.
13. Simó R, Barbosa-Desongles A, Hernandez C, Selva DM. IL1 β down-regulation of sex hormone-binding globulin production by decreasing HNF-4 α via MEK-1/2 and JNK MAPK pathways. *Mol Endocrinol.* 2012;26:1917–1927.
14. Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 1990;4:2353–2365.
15. Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α . *Nature.* 1998;392:512–516.
16. Yuan X, Ta TC, Lin M, et al. Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS One.* 2009;4:e5609.
17. 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;273:34105–34114.
18. Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM, Hammond GL. Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest.* 2007;117:3979–3987.
19. Selva DM, Hammond GL. Thyroid hormones act indirectly to increase sex hormone-binding globulin production by liver via hepatocyte nuclear factor-4 α . *J Mol Endocrinol.* 2009;43:19–27.
20. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:79–83.
21. Oh KW, Lee WY, Rhee EJ, et al. The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;63:131–138.
22. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (Adi-Pose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;221:286–289.
23. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005;26:439–451.
24. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003;423:762–769.
25. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;196:81–98.
26. Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays.* 2001;23:1112–1119.
27. Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem.* 1989;186:129–136.
28. Koo SH, Flechner L, Qi L, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature.* 2005;437:1109–1111.
29. 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.
30. Gannagé-Yared MH, Khalife S, Semaan M, Fares F, Jambart S, Halaby G. 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;155:167–176.
31. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 1:S55–S60.
32. Saha AK, Persons K, Safer JD, Luo Z, Holick MF, Ruderman NB. AMPK regulation of the growth of cultured human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349:519–524.
33. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2011;17:2801–2811.
34. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003;148:293–300.
35. Kotronen A, Yki-Järvinen H, Aminoff A, et al. Genetic variation in the ADIPOR2 gene is associated with liver fat content and its surrogate markers in three independent cohorts. *Eur J Endocrinol.* 2009;160:593–602.

36. Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005;54:117–121.
37. Nedvídková J, Smitka K, Kopský V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res*. 2005;54:133–140.
38. Turer AT, Browning JD, Ayers CR, et al. Adiponectin as an independent predictor of the presence and degree of hepatic steatosis in the Dallas Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:E982–E986.
39. Peter A, Kantartzis K, Machann J, et al. Relationships of circulating sex hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. *Diabetes*. 2010;59:3167–3173.
40. Stefan N, Schick F, Häring HU. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009;361:2675–2676.
41. Neumeier M, Sigrüener A, Eggenhofer E, et al. High molecular weight adiponectin reduces apolipoprotein B and E release in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;12:352:543–548.
42. Liu Q, Yuan B, Lo KA, Patterson HC, Sun Y, Lodish HF. Adiponectin regulates expression of hepatic genes critical for glucose and lipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:14568–14573.
43. Ducluzeau PH, Cousin P, Malvoisin E, et al. Glucose-to-insulin ratio rather than sex hormone-binding globulin and adiponectin levels is the best predictor of insulin resistance in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3626–3631.
44. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002;51:2734–2741.
45. Eglit T, Lember M, Ringmets I, Rajasalu T. Gender differences in serum high-molecular-weight adiponectin levels in metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2013;15:168:385–391.



Get *Session Recording* from the most popular meetings.

endosessions.org



CAPÍTULO III

EL ÁCIDO OLEICO INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE SHBG HEPÁTICA EN HOMBRES

Los niveles circulantes bajos de SHBG constituyen un factor de riesgo independiente de sufrir ECV. Por otro lado, la dieta Mediterránea se ha asociado ampliamente con una reducción en el riesgo de contraer ECV. En numerosos estudios se ha observado que los MUFAs como nutrientes, el aceite de oliva como alimento y la Dieta Mediterránea como patrón de alimentación están relacionados con un menor riesgo cardiovascular. En este trabajo hemos estudiado si el aceite de oliva, fuente principal de grasas en la Dieta Mediterránea, aumenta los niveles de SHBG. Para ello, por un lado, hemos llevado a cabo un estudio en humanos y por otro lado hemos utilizado células HepG2 como modelo *in vitro*.

El estudio en humanos se ha realizado en colaboración con el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Carlos Haya, de Málaga, liderado por el Dr. Soriguer. Se han utilizado muestras de suero de 315 sujetos que han participado en el estudio *PIZARRA*. En este estudio, un grupo de hombres empleó aceite de oliva durante 6 años mientras otro grupo de hombres utilizó otro tipo de aceites ricos en ácido linoleico. Los niveles séricos de SHBG en los sujetos que habían consumido aceite de oliva fueron significativamente mayores que los de los sujetos que consumieron otros aceites ricos en ácido linoleico. Además, los niveles séricos de SHBG de los individuos del estudio se correlacionaron positivamente con el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados en suero y negativamente con el porcentaje de ácidos grasos saturados en suero. Además, después del ajuste por edad e IMC, los niveles de SHBG se relacionaron positivamente con el ratio oleico/esteraico, que sirve como índice de la actividad de la enzima SCD-1 (estearoil-coenzima A desaturasa 1).

Con respecto al estudio *in vitro*, puesto que el ácido oleico es el ácido graso mayoritario en el aceite de oliva, tratamos células HepG2 durante 72 horas con oleil-CoA (100 μ M) y lo comparamos con el tratamiento con linoleil-CoA (100 μ M) o vehículo (PBS). Los niveles de expresión de SHBG y los niveles de SHBG secretada al medio aumentaron tanto a las 48 horas como a las 72 horas con el tratamiento con oleil-CoA. Este aumento se produjo mediante una disminución de los niveles de ARNm y proteína de PPAR γ , uno de los principales factores de transcripción implicados en la regulación de la SHBG. Los niveles de expresión y de proteína del otro factor de transcripción principal para la SHBG, el HNF-4 α , no se modificaron con los tratamientos. Mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) comprobamos que la unión de PPAR γ al promotor de la SHBG fue menor en el tratamiento con oleil-CoA con respecto al tratamiento con linoleil-CoA.

Estos resultados revelan que el consumo de aceite de oliva está asociado con niveles elevados de SHBG. La regulación negativa que ejerce el oleil-CoA sobre el PPAR γ es un mecanismo importante en la regulación de los niveles de SHBG por el ácido oleico del aceite de oliva. Por último,

RESULTADOS

nuestros resultados sugieren que el papel cardioprotector del aceite de oliva podría estar mediado, en parte, por un aumento en los niveles de SHBG.

RESEARCH ARTICLE

Oleic acid increases hepatic sex hormone binding globulin production in men

Cristina Sáez-López^{1,2*}, Federico Soriguer^{2,3*}, Cristina Hernandez^{1,2}, Gemma Rojo-Martinez^{2,3}, Elehazara Rubio-Martín³, Rafael Simó^{1,2**} and David M. Selva^{1,2}

¹ Diabetes and Metabolism Research Unit, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Barcelona, Spain

³ Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Carlos Haya, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain

Scope: Low circulating sex hormone-binding globulin (SHBG) is an independent risk factor for cardiovascular disease. Mediterranean diet has been associated with a decreased risk of cardiovascular disease. We aimed to test the hypothesis that the increase of circulating MUFA associated with olive oil consumption (primary fat source in Mediterranean diet) increases SHBG serum levels.

Methods and results: A total of 315 men were included. In these patients, nutrition data and plasma samples for SHBG assessment were obtained. In vitro studies to examine the effects of oleic and linoleic acid on SHBG production using HepG2 cells were performed. We provided evidence that SHBG serum levels were significantly higher in subjects using olive oil for cooking in comparison with subjects using sunflower oil. The SHBG levels correlated positively with MUFA ($p < 0.001$) and negatively with saturated fatty acids ($p = 0.003$). In the multiple regression analysis, MUFA were independently associated with SHBG levels and accounted for the 20.4% of SHBG variance. In vitro studies revealed that oleoyl-CoA increases SHBG production by downregulating PPAR- γ levels in HepG2 cells.

Conclusion: Olive oil consumption is associated with elevated SHBG serum levels. PPAR- γ downregulation induced by oleoyl-CoA is an important underlying mechanism of such regulation.

Keywords:

Cardiovascular risk / Mediterranean diet / Oleic acid / Olive oil / Sex hormone binding globulin



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Received: April 26, 2013

Revised: August 6, 2013

Accepted: August 13, 2013

1 Introduction

Sex hormone binding globulin (SHBG) is produced and secreted by the human liver to the blood, where it binds an-

drogens and estrogens with high affinity, regulating their bioavailability [1]. Plasma SHBG levels are a useful biomarker for several metabolic and cardiovascular diseases. In this regard, low-plasma SHBG levels are associated with obesity, metabolic syndrome, and predict the development of type 2 diabetes [2–4]. In addition, an inverse relationship between plasma SHBG levels and the risk of cardiovascular disease has been reported [5, 6].

The low-plasma SHBG levels found in obesity and metabolic syndrome have been largely attributed to

Correspondence: Dr. David M. Selva, Diabetes and Metabolism Research Unit., Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

E-mail: david.martinez.selva@vhir.org

Fax: +34-93-489-4205

Abbreviations: SCD1, stearoyl-CoA desaturase1; SHBG, sex hormone-binding globulin

*These authors contributed equally to this work.

**Additional correspondence: Professor Rafael Simó, E-mail: rafael.simo@vhir.org

hyperinsulinemia. However, we have recently demonstrated that proinflammatory cytokines, rather than hyperinsulinemia are the main factor accounting for the low levels of SHBG detected in obesity by decreasing hepatic production of HNF-4 α through nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation or via the MEK-1/2 and c-Jun N-terminal kinases mitogen-activated protein kinases pathways [7–9]. On the other hand, we have found that different nutrients can also modulate SHBG levels. In this regard, high-carbohydrate diets containing sucrose, glucose, or fructose have been shown to decrease SHBG production by reducing hepatic HNF-4 α protein levels [10]. Furthermore, we have also demonstrated that palmitate, a saturated fatty acid, downregulates human SHBG production by affecting *HNF-4A* gene expression [10]. Finally, it should be noted that although HNF-4 α is the most important transcription factor that activates SHBG expression, PPAR- γ plays a crucial role as an inhibitor of SHBG expression [11,12].

The Mediterranean diet is associated with a decreased risk of obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease [13]. In fact, the inhabitants of the Southern European and North African regions surrounding the Mediterranean sea have a longer life expectancy and lower risk of chronic diseases than other regions of the world [14]. To the best of our knowledge, the effect of Mediterranean diet on SHBG levels has not been previously investigated. The primary source of fat intake in the Mediterranean diet is olive oil [15]. The main fatty acid in olive oil is the oleic acid (C18:1), a MUFA omega-9 fatty acid that makes up about 60–80% of olive oil [16].

On this basis, the aim of the present study was to test the hypothesis that the increase of circulating MUFA associated with olive oil consumption results in an increase in SHBG serum levels. In addition, the *in vitro* effects of oleic acid and linoleic acid on SHBG production by liver cells (HepG2) and the underlying mechanisms have been investigated.

2 Materials and methods

2.1 Clinical study

2.1.1 Subjects

The population study was undertaken from the cohort of the Pizarra Study (a southern Spanish population). The characteristics of this study have already been published [17, 18]. Briefly, in 1995–1997, evaluations were made of 1134 persons (443 men and 691 women) selected randomly from the municipal census of Pizarra. Six years later, 928 (341 men and 587 women) of them were evaluated again. At this time, plasma samples for SHBG assessment were obtained in 315 men, who are the subjects included in the current study.

All the subjects underwent measurements of weight, height, and waist and hip circumferences and the BMI was calculated [weight (Kg)/height² (m)]. The clinical features of patients according to the type of oil (olive versus sunflower)

Table 1. Clinical data according to the use of olive oil for cooking

	Olive oil N = 226	Sunflower ^{a)} N = 81	<i>p</i>
Age (years)	50.8 ± 14.5	49.2 ± 13.3	n.s
BMI (kg/m ²)	29.7 ± 4.4	28.7 ± 4.0	n.s
Fasting plasma glucose (mg/dL)	100 ± 25	105 ± 25	n.s
OGTT 2-h plasma glucose (mg/dL)	114 ± 39	119 ± 35	n.s
Total cholesterol (mg/dL)	264 ± 63	253 ± 44	n.s
HDL-cholesterol (mg/dL)	64 ± 15	59 ± 9	n.s
Triglycerides (mg/dL)	120 ± 64	129 ± 57	n.s

OGTT: oral glucose tolerance tests (75 gr).

a) Subjects using other oils (*n* = 8) were not included in this analysis.

consumed are detailed in Table 1. To evaluate food intake, a food frequency questionnaire was administered at baseline and at the end of the follow-up. The surveys were given by experienced dietitians previously trained for this project. After making an appointment by telephone, the dietitians handed over the questionnaire at the homes of the participants and provided information about the nature of the study. Since one of the primary aims of this was to assess the profile of fat intake, detailed information on this issue was obtained as previously reported [19]. In this regard, it should be mentioned that samples of cooking oil being used for frying were obtained from the kitchens of the participants and the type of vegetable oil used to cook was confirmed by gas chromatography. Nutritional details according to the type of oil (olive versus sunflower) consumed are detailed in Table 2.

The study was approved by the Ethics and Clinical Research Committee of Carlos Haya Hospital (Consejería de Salud, Junta de Andalucía; PN: 0189/2008). All participants provided written informed consent. Reporting of this study conforms to STROBE [20] and EQUATOR [21] guidelines.

Table 2. Nutritional data according to the use of olive oil for cooking

	Olive oil N = 226	Sunflower ^{a)} N = 81	<i>p</i>
Energy (kcal/day)	2521 ± 722	2666 ± 717	n.s
Protein (% energy)	15.3 ± 2.6	15.2 ± 2.8	n.s
Carbohydrates (% energy)	45.2 ± 6.9	45.3 ± 6.8	n.s
Total fat (% energy)	39.6 ± 5.6	39.4 ± 5.8	n.s
SFA in SP (%)	47.5 ± 6.8	46.5 ± 6.6	n.s
MUFA in SP (%)	14.6 ± 2.5	12.7 ± 2.4	0.01
<i>n</i> -6 in SP (%)	35.8 ± 5.4	35.7 ± 5.5	n.s
<i>n</i> -3 in SP (%)	5.8 ± 1.6	5.3 ± 1.8	n.s

SP: serum phospholipids.

a) Subjects using other oils (*n* = 8) were not included in this analysis.

2.1.2 Laboratory analysis

SHBG levels (nmol/L) were measured by ELISA (Demeditec Diagnostics, Germany). The intra- and interassay CVs were 5.3 and 8.9%, respectively.

The fatty acid composition of serum phospholipids was determined as described elsewhere [22]. Briefly, after extraction of serum fat with chloroform–methanol (2:1) and butylated hydroxytoluene at 0.025 and phospholipid separation by TLC, fatty acid methyl esters were formed by heating the extracted fat for 30 min with 0.61M H₂SO₄ in anhydrous methanol. After extraction with hexane, fatty acid methyl esters were analyzed in a Hewlett-Packard chromatograph, equipped with a flame ionization detector, and using a BPX75 fused-silica capillary column (SGE, Villebon, France). The methodology to evaluate the composition and quality of the fats used for frying has been previously reported [19].

2.2 Experimental study

2.2.1 Cell culture experiments

Cell culture reagents were from Life Technologies (Invitrogen SA, Barcelona, Spain). HepG2 hepatoblastoma cells (catalog number HB-8065; ATCC) were maintained in low-glucose DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. For experiments, HepG2 cells were cultured to 60–80% confluence prior to the addition of vehicle (PBS) or oleoyl-CoA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) or linoleoyl-CoA (Sigma-Aldrich).

2.2.2 SHBG measurements

SHBG levels in culture medium taken from HepG2 cells were measured using an ELISA (Demeditec Diagnostics).

2.2.3 RNA analyses

Total RNA was extracted from HepG2 cells using TRIzol reagent (Invitrogen SA). Reverse transcription (RT) was performed at 42°C, for 50 min using 3 µg of total RNA and 200 U of Superscript II together with an oligo-dT primer and reagents provided by Invitrogen. An aliquot of the RT product was amplified in a 25 µL reaction using SYBRGreen (Invitrogen SA) with appropriate oligonucleotide primer pairs corresponding to human HNF-4α, human PPAR-γ, human SHBG, and human 18S (Supporting Information Table 1). Results were analyzed using the 7000 SDS program.

2.2.4 Western blot analyses

After treatments, HepG2 cells were homogenized in RIPA buffer with Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche

Diagnostics, Barcelona, Spain). Protein extracts were used for Western blotting with antibodies against human HNF-4α (C-19; catalog sc-6556; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), human PPAR-γ (sc-7196; Santa Cruz Biotechnology) and human PPIA (SA-296; BIOMOL, Madrid, Spain). Specific antibody–antigen complexes were identified using an HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or rabbit anti-goat IgG and chemiluminescent substrates (Pierce Biotechnology, Barcelona, Spain) by exposure to x-ray film.

2.2.5 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

After treatment, HepG2 cells were used to perform ChIP assays with a ChIP-IT kit (Active Motif) as described previously [10]. The purified DNA was subjected to PCR amplification (35 cycles) using specific primers designed to amplify a 262 bp of the human SHBG promoter (Supporting Information Table 1).

2.3 Statistical analyses

The data are presented as the mean and SD. Given their skewed distribution, SHBG was analyzed after log transformation. The differences between means were calculated with the Student's *t*-test or one or more way ANOVA. The correlation between variables was measured with the Spearman *r*. To further explore the variables independently associated with SHBG concentrations, a stepwise multiple regression analysis was performed. The analyses were made using SPSS v10 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3 Results

3.1 SHBG levels are related to circulating MUFA and type of oil used for cooking

The mean (SD) age of subjects included in the study was 46.8 (14.4) years. The composition of saturated fatty acids, MUFA, and *n*-3 fatty acids (PUFA *n*-3) in serum phospholipids was significantly associated with the type of cooking oil used. As expected, MUFA levels (%) were significantly higher in persons using olive oil (14.60 ± 2.50 versus 12.68 ± 2.37; *p* = 0.01) (Table 2).

The mean concentration of SHBG was 27.98 ± 16.06 nmol/L (median: 23.56 nmol/L). SHBG levels were significantly higher in subjects using olive oil for cooking in comparison with subjects using other types of cooking oil (29.79 ± 14.36 nmol/L versus 24.78 ± 10.11 nmol/L; *p* = 0.03 after adjusting by age and BMI).

The SHBG levels correlated positively with age (*r* = 0.35; *p* < 0.0001) and negatively with BMI (*r* = −0.25; *p* < 0.001) (data not shown). The SHBG levels also correlated positively with serum phospholipid MUFA (*r* = 0.35; *p* < 0.0001) and

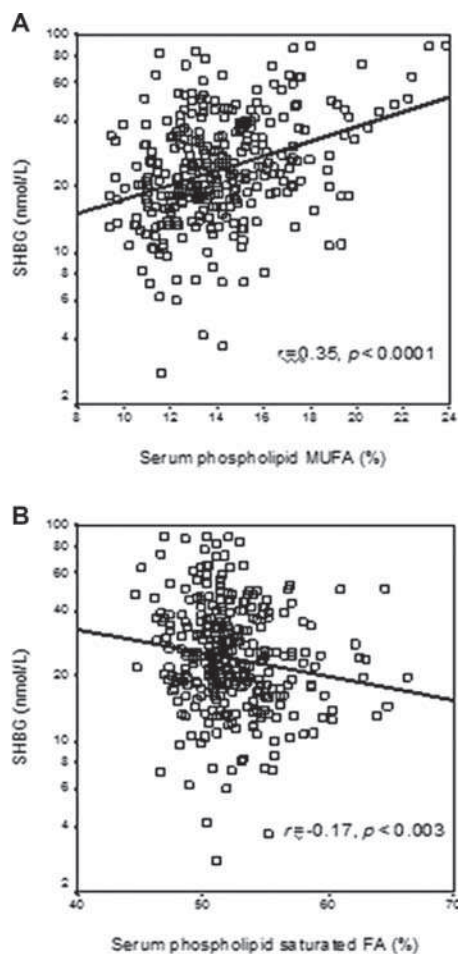


Figure 1. Correlation between SHBG levels and serum phospholipid MUFA (A) and serum phospholipid saturated fatty acids (B).

negatively with phospholipid saturated fatty acids ($r = -0.17$; $p = 0.003$) (Fig. 1). We did not find any significant correlation between SHBG levels and either PUFA $n-6$ ($r = -0.10$; $p = 0.07$) or PUFA $n-3$ ($r = -0.02$; $p = 0.73$) in serum phospholipids (data not shown).

In the multiple regression analysis, SHBG levels were associated with serum phospholipid MUFA ($p < 0.001$), independently of age ($p < 0.001$) and BMI ($p < 0.001$), and fasting plasma glucose ($p = 0.006$) accounted for 20.4% of SHBG variance (Table 3).

Finally, after adjusting for age and BMI, SHBG levels significantly correlated with the ratio of oleic to stearic fatty acid, a recognized index of stearoyl-CoA desaturase1 (SCD1) biological activity ($r = 0.34$; $p < 0.0001$) (Fig. 2).

3.2 Oleoyl-CoA increases SHBG production by HepG2 cells

The effects of daily supplementation of vehicle, oleoyl-CoA (100 μ M) or linoleoyl-CoA (100 μ M) on SHBG production by

Table 3. Variables independently related to SHBG levels (log) in the multiple regression analysis

	B	EE	β	p
Age (years)	0.013	0.002	0.325	<0.001
BMI (Kg/m ²)	-0.031	0.007	-0.220	<0.001
MUFA (%)	0.039	0.013	0.170	0.003
Fasting plasma glucose (mg/dL)	-0.003	0.001	-0.148	0.006
Constant	3.122	0.286		<0.001

HepG2 cells over the course of 3 days were examined. This was done by comparing medium concentrations of SHBG on days 1 and 3 of each treatment. Oleoyl-CoA treatment increased SHBG production by HepG2 cells significantly when compared with vehicle or linoleoyl-CoA treated cells (Fig. 3A). Moreover, oleoyl-CoA treatment also increased SHBG mRNA levels significantly when compared with vehicle- or linoleoyl-CoA-treated cells (Fig. 3B).

3.3 Oleoyl-CoA increases SHBG production by decreasing PPAR- γ levels in HepG2 cells

To determine by which mechanism oleoyl-CoA treatment was increasing SHBG production when compared with linoleoyl-CoA treatment, we decided to measure the mRNA and protein levels of two important transcription factors that regulate SHBG expression, HNF-4 α and PPAR- γ [11, 23]. We found that oleoyl-CoA treatment did not change HNF-4 α mRNA levels while it reduced PPAR- γ mRNA levels significantly when compared with vehicle- or linoleoyl-CoA-treated HepG2 cells (Fig. 4A). Moreover, oleoyl-CoA treatment did not change HNF-4 α protein levels while it reduced PPAR- γ protein levels

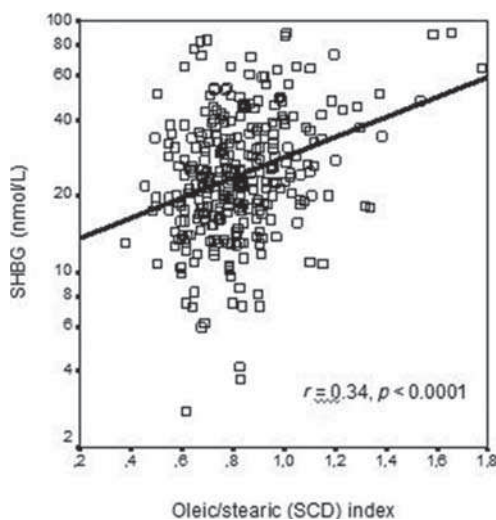


Figure 2. Correlation between SHBG levels and the ratio oleic to stearic fatty acid (a marker of SCD1 activity).

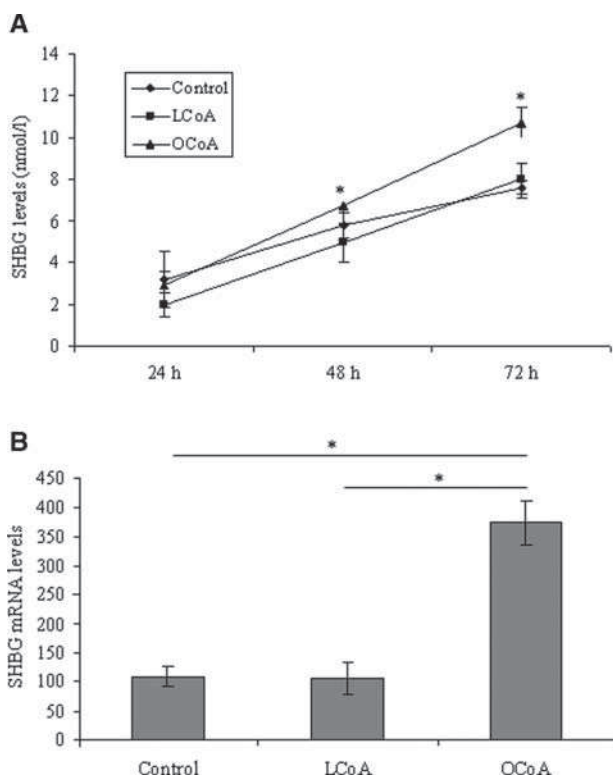


Figure 3. Daily treatment with oleoyl-CoA increases SHBG production when compared with vehicle or linoleoyl-CoA over 3 days in HepG2 cells. (A) SHBG accumulation in the medium of HepG2 cells treated daily with vehicle, oleoyl-CoA (100 μ M) or Linoleoyl-CoA (100 μ M) was measured using an ELISA. (B) Analysis of SHBG mRNA levels in HepG2 cells treated as in A. Human 18S (h18S) rRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

significantly when compared with vehicle- or linoleoyl-CoA-treated HepG2 cells (Fig. 4B).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using DNA/protein complexes extracted from HepG2 cells treated with oleoyl-CoA or linoleoyl-CoA revealed that in oleoyl-CoA-treated cells, there was a reduction of PPAR- γ binding in the *SHBG* proximal promoter when compared with linoleoyl-CoA-treated cells (Fig. 4C).

4 Discussion

Low-plasma levels of SHBG are a risk factor for the development of cardiovascular disease [5, 6]. Mediterranean populations have been reported to have among the highest life expectancies and the lowest incidence rates of cardiovascular mortality in the world, and the consumption of olive oil is a common denominator in Mediterranean diets [13]. In the present study, performed in a cohort of Mediterranean origin (the Pizarra cohort study), we found a clear relationship between the consumption of olive oil and SHBG lev-

els. It is worth mentioning that we previously reported that SHBG levels were negatively associated with the risk of type 2 diabetes, obesity, and insulin resistance in this specific population [18, 19, 21, 22, 24, 25].

Several reports in the literature have previously addressed the relation between dietary composition and SHBG levels with contradictory results. Indeed, it has been reported that a high-fiber diet decreases SHBG levels [25, 26], whereas vegetarians have increased plasma SHBG levels compared to nonvegetarians [26–28]. Regarding protein intake, it has been reported that a high-protein diet increased SHBG levels [29]. However, diets low in proteins in elderly men may lead to elevated SHBG levels [30] that support previous results obtained in rabbits [31]. Finally, it has been shown that changing the diet from one with a high fat to low-fat content (less than 20 g fat per day) for a further 2-week period results in a significant increase in SHBG levels [32]. However, to the best of our knowledge, this is the first study to examine the effect of olive oil consumption on SHBG levels. It should be noted that the higher SHBG levels observed in subjects using olive oil for cooking were not explained by differences in carbohydrates, proteins, or total fat intake.

In the present study, we found that SHBG levels were directly correlated with MUFA and inversely correlated with saturated fatty acids. By contrast, no correlation between SHBG and PUFAs was detected. It is known that the fatty acid composition in serum cholesteryl esters and in serum phospholipids to a certain extent mirrors not only the fatty acid composition of dietary fat, but also endogenous fatty acid synthesis, where desaturases play an important role. Our results showed that plasma SHBG levels directly correlated with the ratio of oleic acid (18:1) to stearic acid (18:0), the SCD-18 ratio, a reliable marker of SCD1 activity [33]. SCD1, anchored in the ER, is a rate-limiting enzyme in the biosynthesis of MUFAs. SCD1, which catalyzes the $\delta 9$ -cis desaturation of saturated fatty acids, converts palmitate and stearate into palmitoleate and oleate, the predominant unsaturated fatty acids present in membrane phospholipids [33]. Because of the difficulties of directly measuring SCD1 activity in humans, SCD1 activity is proxied by the use of SCD-18 ratio [34]. However, it has been demonstrated that the SCD-18 ratio overestimates SCD1 activity in individuals consuming diets with a high content of oleic acid [35, 36]. Therefore, the reported relationship between SCD1 activity and obesity or insulin resistance [37] should be carefully interpreted in those patients in whom MUFA-rich olive oil is the primary source of oleic acid. Nevertheless, in view of the independent correlation detected between SHBG levels and the ratio of oleic to stearic acid, specific studies addressed to determining the underlying link between SHBG and SCD1 activity are needed.

Since the most abundant fatty acid in olive oil is oleic acid, we next wanted to study in vitro, using human hepatoblastoma HepG2 cells, the effects on SHBG production of oleoyl-CoA and linoleoyl-CoA, a PUFA *n*-6 acid. We found that daily treatment with oleoyl-CoA increases SHBG production in

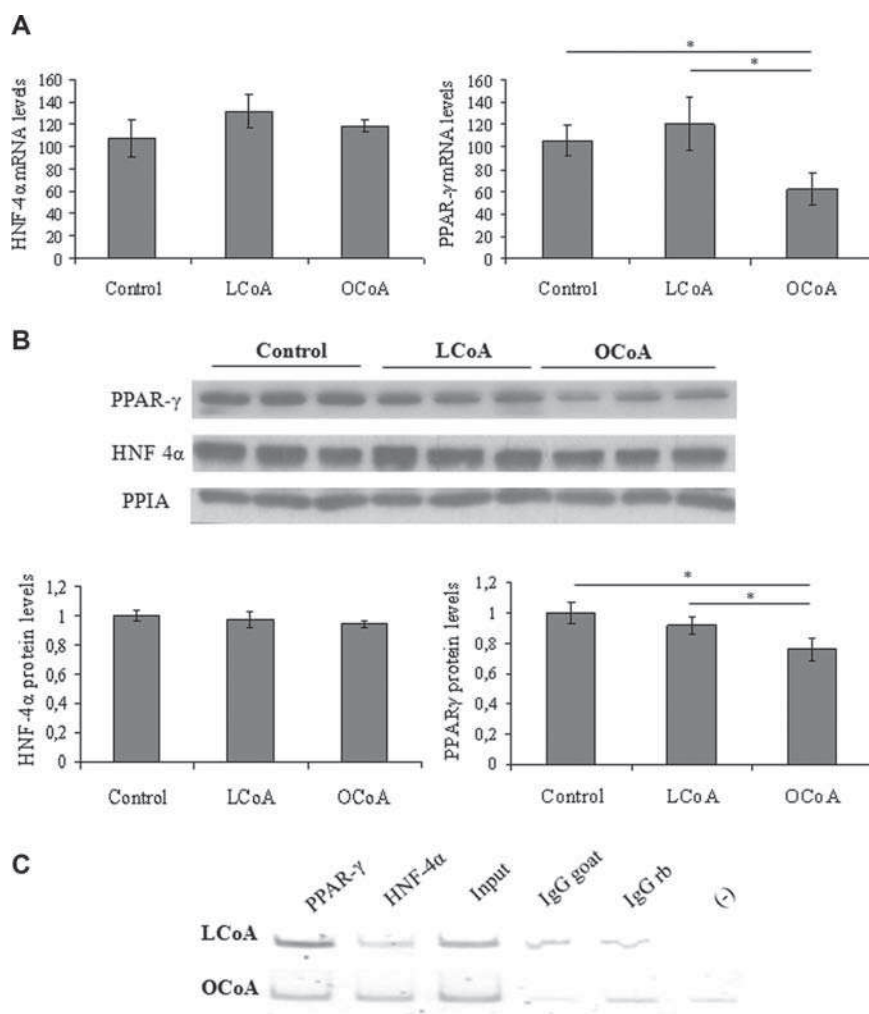


Figure 4. Oleoyl-CoA increases SHBG production by decreasing PPAR- γ levels. (A) Analysis of HNF-4 α and PPAR- γ mRNA levels in HepG2 cells daily treated with vehicle, oleoyl-CoA (100 μ M) or linoleoyl-CoA (100 μ M). Human 18S (h18S) rRNA was amplified as a control. Data points are shown as mean \pm SD of triplicates. * p < 0.05; ** p < 0.01. (B) Western blot of HNF-4 α , PPAR- γ , and PPIA in total cell protein extracts of HepG2 cells treated as in A. (C) ChIP assays of HNF-4 α and PPAR- γ binding to the human *SHBG* promoter in HepG2 cells treated with oleoyl-CoA (100 μ M) or linoleoyl-CoA (100 μ M) for 3 days. A nonspecific rabbit or goat IgGs were used in ChIP reactions to control for nonspecific immunoprecipitation. Positive PCR controls of sheared genomic DNA templates indicated the integrity of the input DNA used in the ChIP reactions.

HepG2 cells when compared with linoleoyl-CoA treatment. Moreover, cells treated with oleoyl-CoA have increased levels of SHBG mRNA when compared with linoleoyl-CoA-treated cells. In addition, we previously demonstrated that palmitate, a saturated fatty acid, downregulates SHBG production by HepG2 cells through the reduction of HNF-4 α levels [10].

The advancement in the study of the mechanisms regulating SHBG production has considerably improved after the identification of the footprint regions (FP) of the human *SHBG* promoter [11, 23, 38] and the transcription factors that bind to these regions [11, 23, 38]. Thus, it has been shown that HNF-4 α transcription factor upregulates SHBG production by binding to FP1 and/or FP3 regions while PPAR- γ downregulates SHBG expression by binding to the FP3 region of the *SHBG* promoter [11, 23, 38]. For these reasons, we explored whether the increase in SHBG production in HepG2 cells after treatment with oleoyl-CoA involved changes in cellular HNF-4 α and PPAR- γ levels. Our results showed that oleoyl-CoA treatment did not influence *HNF-4A* gene expression and HNF-4 α protein levels when compared with linoleoyl-CoA-treated HepG2 cells. However,

oleoyl-CoA treatment reduced *PPARG* gene expression and PPAR- γ protein levels when compared with linoleoyl-CoA-treated HepG2 cells. Remarkably, oleoyl-CoA treatment reduced PPAR- γ binding and increased HNF-4 α binding to the human *SHBG* promoter in ChIP assays. Therefore, our results suggest that PPAR- γ downregulation is a mechanism involved in the oleoyl-CoA induced increase of SHBG serum levels.

The main limitations of the present study are the limited size of the study sample and the fact that the results obtained cannot be generalized to women. In this regard, the possibility that the regulation of SHBG expression by oleic acid could be modulated or even attenuated by estradiol cannot be ruled out.

In summary, the intake of olive oil is associated with elevated levels of SHBG and the PPAR- γ downregulation induced by oleoyl-CoA seems to be an important underlying mechanism in such regulation. Since olive oil is one of the main components of the Mediterranean diet and SHBG levels have been associated with a lower risk of cardiovascular disease, specific studies addressed to examine the role of SHBG

and its relationship with olive oil consumption in the cardiovascular protective effects of the Mediterranean diet seem warranted.

D.M.S. and G.R.M. are recipients of a Miguel Servet contract. We thank Lorena Ramos, Research Institute Hospital Vall d'Hebron, for her technical assistance. D.M.S. is the guarantor and takes full responsibility for the manuscript and its originality. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an initiative of ISCIII (Ministerio de Economía y Competitividad). CP08/00058 and PI09/144 from the Instituto de Salud Carlos III (DMS).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Siiteri, P. K., Murai, J. T., Hammond, G. L., Niskier, J. A. et al., The serum transport of steroid hormones. *Recent. Prog. Horm. Res.* 1982, *38*, 457–510.
- [2] Li, C., Ford, E. S., Li, B., Giles, W. H., Liu, S., Association of testosterone and sex hormone-binding globulin with metabolic syndrome and insulin resistance in men. *Diabetes Care* 2010, *33*, 1618–1624.
- [3] Ding, E. L., Song, Y., Manson, J. E., Hunter, D. J. et al., Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N. Engl. J. Med.* 2009, *361*, 1152–1163.
- [4] Bonnet, F., Balkau, B., Malécot, J. M., Picard, P. et al., DESIR Study Group. Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. *Eur. J. Endocrinol.* 2009, *161*, 81–85.
- [5] Sutton-Tyrrell, K., Wildman, R. P., Matthews, K. A., Chae, C. 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*, 1242–1249.
- [6] Karim, R., Hodis, H. N., Stanczyk, F. Z., Lobo, R. A., Mack, W. J., Relationship between serum levels of sex hormones and progression of subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008, *93*, 131–138.
- [7] Simó, R., Barbosa-Desongles, A., Lecube, A., Hernandez, C., Selva, D. M., Potential role of tumor necrosis factor- α in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes* 2012, *61*, 372–382.
- [8] Simó, R., Barbosa-Desongles, A., Saez-Lopez, C., Lecube, A. et al., Molecular Mechanism of TNF α -Induced Down-Regulation of SHBG Expression. *Mol. Endocrinol.* 2012, *26*, 438–446.
- [9] Simó, R., Barbosa-Desongles, A., Hernandez, C., Selva, D. M., IL1 β down-regulation of sex hormone-binding globulin production by decreasing HNF-4 α via MEK-1/2 and JNK MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.* 2012, *26*, 1917–1927.
- [10] Selva, D. M., Hogeveen, K. N., Innis, S. M., Hammond, G. L., Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J. Clin. Invest.* 2007, *117*, 3979–3987.
- [11] Selva, D. M., Hammond, G. L., Peroxisome-proliferator receptor gamma represses hepatic sex hormone-binding globulin gene. *Endocrinology* 2009, *150*, 2183–2189.
- [12] Mousavinasab, F., Tähtinen, T., Jokelainen, J., Koskela, P. et al., The Pro12Ala polymorphism of the PPAR gamma 2 gene influences sex hormone-binding globulin level and its relationship to the development of the metabolic syndrome in young Finnish men. *Endocrine* 2006, *30*, 185–190.
- [13] López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Ros, E., De Caterina, R. 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*, 284–294.
- [14] Soriguer, F., García-Escobar, E., Morcillo, S., García-Fuentes, E. et al., Mediterranean diet and the Spanish paradox. A hypothesis. *Med. Hypotheses* 2013, *80*, 150–155.
- [15] Galli, C., Visioli, F., Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids* 1999, *34*(Suppl), S23–26.
- [16] Visioli, F., Galli, C., Antiatherogenic components of olive oil. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2001, *3*, 64–67.
- [17] Soriguer, F., Rojo-Martinez, G., Almaraz, M. C., Esteva, I. et al., Incidence of type 2 diabetes in southern Spain (Pizarra Study). *Eur. J. Clin. Invest.* 2008, *38*, 126–133.
- [18] Soriguer, F., Rubio-Martín, E., Fernández, D., Valdés, S. et al., Testosterone, SHBG and risk of type 2 diabetes in the second evaluation of the Pizarra cohort study. *Eur. J. Clin. Invest.* 2012, *42*, 79–85.
- [19] Soriguer, F., Almaraz, M. C., García-Almeida, J. M., Cardona, I. et al., Intake and home use of olive oil or mixed oils in relation to healthy lifestyles in a Mediterranean population. Findings from the prospective Pizarra study. *Br. J. Nutr.* 2010, *103*, 114–122.
- [20] Elm, E., Altman, D. G., Egger, M., Pocock, S. J. et al., The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Lancet* 2007, *370*, 1453–1457.
- [21] Simera, I., Moher, D., Hoey, J., Schulz, K. F., Altman, D. G., A catalogue of reporting guidelines for health research. *Eur. J. Clin. Invest.* 2010, *40*, 35–53.
- [22] Soriguer, F., Rojo-Martínez, G., Dobarganes, M. C., García Almeida, J. M. et al., Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, *78*, 1092–1097.
- [23] Jänne, M., Hammond, G. L., Hepatocyte nuclear factor-4 controls transcription from a TATA-less human sex hormone-binding globulin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 1998, *273*, 34105–34114.
- [24] Soriguer, F., Esteva, I., Rojo-Martinez, G., Ruiz de Adana, M. S. et al., Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). *Eur. J. Endocrinol.* 2004, *150*, 33–39.
- [25] Goldin, B. R., Woods, M. N., Spiegelman, D. L., Longcope, C. et al., The effect of dietary fat and fiber on serum estrogen

- concentrations in premenopausal women under controlled dietary conditions. *Cancer* 1994, *S74*, 1125–1131.
- [26] Key, T. J. A., Roe, L., Thorogood, M., Moore, J. W. et al., Testosterone, sex hormone-binding globulin, calculated free testosterone, and oestradiol in male vegans and omnivores. *Br. J. Nutr.* 1990, *64*, 111–119.
- [27] Belanger, A., Locong, A., Noel, C., Cusan, L. et al., Influence of diet on plasma steroid and sex plasma binding globulin levels in adult men. *J. Steroid. Biochem.* 1989, *32*, 829–833.
- [28] Armstrong, B. K., Brown, J. B., Clarke, H. T., Crooke, D. K. et al., Diet and reproductive hormones: a study of vegetarian and nonvegetarian postmenopausal women. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1981, *67*, 761–767.
- [29] Vermeulen, A., Kaufman, J. M., Giagulli, V. A., Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996, *81*, 1821–1826.
- [30] Longcope, C., Feldman, H. A., McKinlay, J. B., Araujo, A. B., Diet and sex hormone-binding globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, *85*, 293–296.
- [31] Longcope, C., Yosha, S., Young, R. A., Baker, S., Braverman, L. E., The effects of low-protein diet and testosterone on sex hormone-binding globulin capacity in male rabbits. *Metabolism* 1987, *36*, 703–707.
- [32] Reed, M. J., Cheng, R. W., Simmonds, M., Richmond, W., James, V. H., Dietary lipids: an additional regulator of plasma levels of sex hormone binding globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987, *64*, 1083–1085.
- [33] Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid. Res.* 2004, *43*, 91–104.
- [34] Vinknes, K. J., Elshorbagy, A. K., Nurk, E., Drevon, C. A. et al., Plasma stearoyl-CoA desaturase indices: Association with lifestyle, diet and body composition. *Obesity (Silver Spring)* 2013, *21*, E294–302.
- [35] Vessby, B., Uusitupa, M., Hermansen, K., Riccardi, G. et al., Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 2001, *44*, 312–319.
- [36] Warensjö, E., Risérus, U., Gustafsson, I. B., Mohsen, R. et al., Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008, *18*, 683–690.
- [37] Sampath, H., Ntambi, J. M., The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2011, *1243*, 47–53.
- [38] Selva, D. M., Hogeveen, K. N., Hammond, G. L., Repression of the human sex hormone-binding globulin gene in Sertoli cells by upstream stimulatory transcription factors. *J. Biol. Chem.* 2005, *280*, 4462–4468.

DISCUSIÓN

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA SHBG EN EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD DE ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA

Los niveles de SHBG se encuentran bajos en el plasma de personas obesas de todas las edades [121-123] y en personas que sufren enfermedades asociadas, como síndrome metabólico [425] o DMT2 [131,138,426]. Además, niveles bajos de esta proteína constituyen un factor de riesgo de sufrir ECV [146,427]. Los niveles de SHBG se emplean también como medida indirecta de los esteroides libres en sangre [14]. Desde hace años, en nuestro laboratorio se estudian factores que regulan la expresión y producción de SHBG por condicionantes propios de estas situaciones patológicas. Sin embargo, hasta ahora no se han descrito los mecanismos moleculares por los que los niveles de SHBG disminuyen durante el desarrollo de la obesidad y las patologías asociadas a ella y si esta disminución juega algún papel activo en el desarrollo de las mismas. En esta tesis, he abarcado el estudio de ambos interrogantes, para conocer los factores de transcripción implicados en la regulación de la SHBG en la obesidad y el papel de la SHBG sobre la NAFLD, una de las patologías metabólicas que resultan más frecuentes entre la población obesa.

Para ello, como se explica en el CAPÍTULO I y en el ANEXO, se ha desarrollado un modelo de ratón doble transgénico, que expresa SHBG en el hígado y padece obesidad, DMT2 e hígado graso, entre otras comorbilidades. Como ya se indicó en la introducción, los ratones no poseen SHBG en la sangre, puesto que, a diferencia de lo que ocurre en humanos y otros vertebrados, no expresan SHBG en el hígado [30,32,85], sino que lo hacen en las células de Sertoli de los testículos [31,75,428], debido a un cambio evolutivo en el sitio de expresión y la función de la SHBG. Ésto constituye una limitación para el estudio de la regulación de la SHBG *in vivo*, que se solucionó en los años 90 cuando en el laboratorio del Prof G. Hammond se desarrollaron dos líneas de ratones transgénicos para la SHBG humana, que expresan SHBG en el hígado y la secretan al torrente circulatorio [36]. Mediante el cruce de estos ratones transgénicos *shbg* con ratones C57BL/ksJ-db/db (db/db), que a las cuatro semanas presentan hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidad, DMT2 y NAFLD entre otras condiciones patológicas [367,429], hemos desarrollado un modelo de ratón SHBG-db/db, en el cual hemos estudiado la regulación de la SHBG y su implicación en el desarrollo de la esteatosis hepática que sufre el ratón db/db. Hemos comparado los ratones de este genotipo con ratones obesos db/db y delgados db/+ y SHBG-db/+.

El peso y la glicemia de los ratones obesos db/db y SHBG-db/db fue significativamente mayor que el de los delgados db/+ y SHBG-db/+. Entre los ratones delgados db/+ y *shbg*-db/+ no encontramos diferencias fenotípicas. En cuanto a los ratones obesos (db/db y SHBG-db/db), en la

sexta semana de vida, la presencia de SHBG en los ratones SHBG-db/db dio lugar a una reducción de su peso entre un 15 y un 20% con respecto a los ratones db/db, mientras que la glicemia no varió entre ellos. La diferencia de peso se produjo a expensas sobre todo de una disminución en el peso del hígado, el tejido adiposo visceral y el riñón de los ratones SHBG-db/db en el caso de los machos, y del tejido adiposo visceral y el riñón en el caso de las hembras. Este porcentaje de reducción de peso, aunque parece pequeño es de gran importancia, ya que en humanos se ha observado que una disminución de peso más modesta, de un 10%, tiene efectos beneficiosos sobre el control glicémico, la presión sanguínea y los niveles de colesterol [430]. Sin embargo, los ratones SHBG-db/db machos y hembras no mostraron una mejora en los niveles de glucosa, de colesterol, ni de otros parámetros metabólicos como los triglicéridos, ácidos grasos libres o la insulinemia y leptinemia con respecto a los ratones db/db. Ésto podría deberse a que el db/db es un modelo murino extremo de resistencia a la insulina y síndrome metabólico, en el cual la reducción de peso del 15-20% propiciada por la SHBG no es suficiente para observar una mejora. Por otro lado, el modelo de ratón db/db también se caracteriza por presentar hiperlipidemia [431]. El hecho de que los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres no disminuyan en el ratón doble transgénico SHBG-db/db coincide con los datos de otros modelos de ratón en los que han afectado directamente a la lipogénesis hepática, como son los *knockout* (KO) de las enzimas lipogénicas ACC o ACLY, en los que la ausencia de estas enzimas clave no ha afectado a los niveles plasmáticos de triglicéridos [310,432].

Tal y como ocurre comunmente en personas obesas [348,433], en nuestro modelo de ratón SHBG-db/db en ambos sexos encontramos acumulación parcial de grasa en el hígado y unos niveles de triglicéridos hepáticos significativamente mayores que los del ratón delgado SHBG-db/+, lo cual es característico de NAFLD. Además, al igual que en los pacientes obesos y en los pacientes con NAFLD, encontramos niveles plasmáticos y de expresión hepática de SHBG menores en los ratones obesos SHBG-db/db que en los ratones delgados SHBG-db/+.

Para analizar por qué mecanismo ocurre la disminución en los niveles plasmáticos de SHBG en los ratones obesos y diabéticos SHBG-db/db, analizamos los niveles de HNF-4 α y PPAR γ , los principales factores de transcripción implicados en la regulación de la SHBG. El HNF-4 α es el responsable principal de la expresión hepática de la SHBG [46], activándola mediante su unión al FP1 del promotor proximal de la SHBG [46] y se ha visto implicado en la regulación de la SHBG por citoquinas proinflamatorias como el TNF α o la IL-1 β [207,208], que reducen su producción. Además, los niveles de este factor de transcripción disminuyen debido a un aumento en la lipogénesis hepática, como se comprobó con la suplementación con fructosa y glucosa en HepG2 y en el ratón *shbg*, en la que la síntesis de palmitato inducida por estos monosacáridos dio lugar a la reducción en los niveles de SHBG mediante una disminución del HNF-4 α [193]. En cuanto al PPAR γ , este factor de

transcripción reprime la expresión hepática del gen de la SHBG uniéndose al FP3 de su promotor proximal [49]. Ésto podría parecer contradictorio puesto que la rosiglitazona, un agonista del PPAR γ , aumenta los niveles plasmáticos de SHBG en pacientes en los que es utilizado como fármaco [182,434-436]. Sin embargo, este aumento en los niveles de SHBG por la rosiglitazona se atribuye a una mejora en la glicemia y en la sensibilidad a la insulina, situaciones que propiciarían un aumento en los niveles de HNF-4 α , lo cual explica el aumento en la SHBG. Además, el tratamiento con antagonistas de PPAR γ o su inhibición mediante ARN de interferencia dan lugar a un aumento en los niveles de SHBG en células HepG2 y ratones transgénicos para la SHBG [49]. Por otra parte, las personas homocigotas para la variante PPAR γ -2 Pro12 presentan niveles plasmáticos de SHBG menores que aquellas que expresan la variante PPAR γ -2 Ala12 [126], lo que concuerda con que la primera variante, PPAR γ -2 Pro12, es más activa transcripcionalmente que la segunda, PPAR γ -2 Ala12. Ésto también concuerda con que los individuos homocigotos para el alelo PPAR γ -2 Ala12 tienen un menor IMC y más sensibilidad a la insulina [437], ambas condiciones ligadas a niveles más elevados de SHBG.

En nuestro modelo de ratón obeso y diabético sobreexpresor de SHBG, SHBG-db/db, tanto en machos como en hembras, los niveles hepáticos de ARNm y proteína de HNF-4 α fueron menores que en el ratón sobreexpresor de SHBG delgado SHBG-db/+, mientras que los niveles de PPAR γ se encontraron aumentados en el obeso SHBG-db/db. Además, los niveles de expresión de SHBG se correlacionaron positivamente con los de HNF-4 α y negativamente con los de PPAR γ en ratones delgados y obesos machos y hembras. Por ensayo CHIP en tejido hepático de estos ratones comprobamos que realmente la disminución en los niveles de SHBG en los ratones obesos y diabéticos SHBG-db/db se debe a la disminución del HNF-4 α y al aumento del PPAR γ , ya que observamos que la unión de HNF-4 α al promotor de la SHBG se producía en mayor medida en los ratones delgados SHBG-db/+ que en los obesos SHBG-db/db mientras que la unión del PPAR γ al promotor de la SHBG era mayor en los ratones SHBG-db/db que en los SHBG-db/+. Asimismo, el papel de estos dos factores de transcripción sobre la SHBG en este modelo murino viene apoyado por una disminución de la transcripción de genes diana de HNF-4 α (Cyp2d9, ApoB) y un aumento de los genes diana de PPAR γ (LXR, ACC y ACLY) en los ratones SHBG-db/db con respecto a los ratones SHBG-db/+.

Estos resultados concuerdan con las acciones de estos factores de transcripción sobre la SHBG observadas hasta ahora. Así pues, como ocurrió con la disminución de SHBG debida a la acumulación de palmitato que ya hemos mencionado en los ratones transgénicos para la SHBG [193], la acumulación hepática de lípidos que encontramos en el ratón obeso SHBG-db/db daría lugar a la disminución en los niveles de HNF-4 α , que producirían la reducción en los niveles plasmáticos de

SHBG en este modelo obeso SHBG-db/db. Asimismo, en los modelos obesos ob/ob y db/db ya se han descrito niveles hepáticos elevados de PPAR γ con respecto a los ratones *wild-type* [438]. La presencia de hígado graso en estos modelos de ratón obeso así como en nuestro modelo de ratón SHBG-db/db produciría un aumento en los niveles hepáticos de PPAR γ , lo cual da lugar a la reducción en SHBG en estos ratones doble transgénicos.

Para estudiar si lo que ocurre en el ratón en relación a la reducción de HNF-4 α y aumento de PPAR γ se cumplía en humanos, analizamos la expresión de estos factores de transcripción y su correlación con los niveles de expresión de SHBG en un set de biopsias hepáticas humanas en pacientes con un rango de IMC entre 32 y 52 kg/m². Los niveles de expresión de SHBG se correlacionaron positivamente con los de HNF-4 α y negativamente con los de PPAR γ 2. Ésto puede deberse al incremento en lipogénesis por causas genéticas o factores dietéticos, que da lugar a la acumulación de grasa en el hígado que ocurre en la obesidad. En el caso del PPAR γ , en pacientes obesos que sufren NAFLD se ha observado un aumento en los niveles hepáticos de este factor de transcripción con respecto a individuos no obesos [360]. Este aumento puede darse por el incremento en prostaglandinas y leucotrienos, a través de la actividad de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa debido al aumento en la lipogénesis hepática. Por su parte, como ya hemos mencionado, el aumento en la acumulación hepática de lípidos y en la lipogénesis, como se observó con el contenido en palmitato [193], produce una disminución de HNF-4 α , lo cual se ha observado en pacientes con NAFLD [175], con la consecuente reducción en los niveles de SHBG.

En los pacientes que sufren obesidad, NAFLD o DMT2, los niveles plasmáticos de testosterona total son bajos, predicen el desarrollo de obesidad central y acumulación de grasa intraabdominal [439] y están asociados con un mayor riesgo de padecer síndrome metabólico [425]. En nuestros ratones obesos SHBG-db/db los niveles de testosterona plasmática total fueron menores que en los delgados SHBG-db/+. El hecho de que los niveles de testosterona disminuyan cuando hay reducción en la SHBG se debe a que cuando se produce la unión de la testosterona a la SHBG en la circulación sistémica, ésta estabiliza el esteroide, aumentando su vida media [14], por tanto, la falta de SHBG da lugar a una mayor excreción urinaria de testosterona y niveles más bajos en sangre.

Con los resultados obtenidos mediante la caracterización de este nuevo modelo de ratón doble transgénico que desarrolla obesidad, NAFLD y expresa SHBG se ha podido comprobar que este modelo mimetiza lo que ocurre en estas enfermedades en humanos en términos de reducción de SHBG y de testosterona [426,439], así como en los niveles de HNF-4 α y PPAR γ . Por lo tanto, este nuevo ratón transgénico constituye un buen modelo para estudiar la regulación de la SHBG en el

desarrollo de estas patologías. Además, puede servir para desarrollar terapias que incrementen los niveles de SHBG y de testosterona total en pacientes obesos.

A continuación hemos utilizado este nuevo modelo de ratón transgénico para estudiar el papel de la SHBG en el desarrollo de NAFLD. Los resultados de este trabajo se presentan como ANEXO de esta tesis y serán brevemente explicados a continuación.

Estudios epidemiológicos han demostrado que los pacientes con NAFLD presentan bajos niveles plasmáticos de SHBG [440,441] y los niveles elevados de SHBG plasmática están asociados con un menor riesgo de sufrir esta patología hepática [442]. También los niveles plasmáticos de SHBG se han visto inversamente relacionados con el grado de esteatosis hepática en pacientes diabéticos tipo 2 [154]. Además, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los monosacáridos, como fructosa o glucosa, que juegan un papel importante en la lipogénesis *de novo* y en el desarrollo de la NAFLD, reprimen la expresión y producción de SHBG [193]. Con estas evidencias, nos propusimos estudiar si la disminución de la SHBG juega algún papel en el desarrollo de la NAFLD.

Para ello utilizamos dos modelos murinos de NAFLD: un modelo genético de NAFLD, obtenido mediante el desarrollo del ratón SHBG-db/db, donde estudiamos si la sobreexpresión de la SHBG afecta al acúmulo de grasa en el hígado; un modelo de NAFLD inducido por la dieta.

La caracterización del modelo SHBG-db/db permitió determinar que los ratones obesos db/db y SHBG-db/db tienen un peso mayor que los ratones delgados db/+ y SHBG-db/+. Es importante destacar que la diferencia de peso entre los ratones machos y hembras SHBG-db/db y db/db (los ratones SHBG-db/db pesan entre 10-15% menos) se produce a expensas en parte al peso del hígado en los animales de sexo masculino, cuyo peso en los ratones SHBG-db/db representa un 23% menos que el de los db/db. En hembras, sin embargo, no observamos esta diferencia significativa en el peso de sus hígados, tan sólo disminuye en un 4,3% el peso del hígado de los ratones hembra SHBG-db/db con respecto a los db/db. Después de un estudio histológico de las secciones de hígado teñidas con hematoxilina-eosina se pudo determinar que los ratones delgados db/+ y SHBG-db/+ presentan una histología hepática normal, mientras que los ratones db/db presentan gran acumulación de grasa de tipo microvesicular o mediovesicular de forma mayoritaria, como ya está descrito [443]. La NAFLD presente en los db/db se debe a que estos ratones presentan diabetes y resistencia a la insulina, lo cual estimula la lipogénesis hepática *de novo* [444]. La presencia de SHBG en los ratones SHBG-db/db dio lugar a una reducción en las vacuolas lipídicas en

los hepatocitos en comparación con los db/db. Esta disminución parcial en la acumulación de grasa hepática se tradujo en un nivel de triglicéridos hepáticos menor en los ratones SHBG-db/db.

La alimentación con una dieta rica en fructosa también genera un modelo de esteatosis hepática. De hecho varios autores sugieren que la mayor prevalencia de este desorden, así como de la obesidad, la DMT2 y el síndrome metabólico, se debe en gran parte al fuerte incremento en el consumo de productos que contienen este monosacárido durante las últimas décadas [445-448]. En varios estudios en humanos, se ha observado que el consumo elevado de fructosa aumenta la lipogénesis *de novo*, con la consiguiente acumulación de grasa hepática [449] y la presencia de NAFLD está relacionada con la cantidad de fructosa [446,450] y refrescos con edulcorantes basados en fructosa ingeridos [451]. Además, la dieta rica en fructosa ha sido utilizada con anterioridad como modelo para generar esta patología hepática en roedores [452-455]. En nuestro caso, tras 8 semanas de ingestión de esta dieta, los ratones *wild-type* acumularon gran cantidad de vacuolas lipídicas en el hígado, sobre todo de tipo microvesicular, mientras que los ratones *shbg* mostraron protección frente a esta acumulación de grasa y su nivel de triglicéridos en hígado es también menor que el de los *wild-type*.

El papel de la testosterona sobre el desarrollo de NAFLD se ha estudiado en humanos con resultados contradictorios. Por una parte, en un estudio en el que participaron hombres entre 36 y 69 años que habían desarrollado NAFLD, la terapia con testosterona durante un año mejoró esta patología [456] mientras que en otro estudio con hombres mayores de 65 años, el tratamiento con testosterona durante seis meses no redujo la acumulación de grasa en el hígado [457]. El hecho de que nuestros ratones SHBG-db/db tanto machos como hembras estén parcialmente protegidos frente a la acumulación de grasa hepática nos hace pensar que la sobreexpresión de SHBG es importante para esta protección independientemente de la testosterona. Sin embargo, los ratones transgénicos para la SHBG contienen de 10 a 100 veces más testosterona que los ratones *wild-type* [36]. Con la finalidad de descartar que la protección frente a la acumulación de grasa fuese efecto de los altos niveles de testosterona y no de la SHBG, se castró un grupo de ratones machos SHBG-db/db. Se pudo comprobar que el hígado de los ratones castrados SHBG-db/db tenía un peso similar y se encontraba, como en los ratones SHBG-db/db no castrados, protegido de forma parcial de la acumulación de vacuolas lipídicas. Además, el nivel de triglicéridos hepáticos de estos ratones fue también similar al de los SHBG-db/db no castrados y menor al de los db/db. Estos resultados concuerdan con un estudio reciente en el que se ha encontrado que la SHBG, pero no la testosterona libre o la testosterona total, se asocia con NAFLD en pacientes con DMT2 [440].

Para explicar el efecto de la SHBG sobre la acumulación de lípidos en hígado, realizamos un análisis utilizando microarrays de ARN de tejido hepático de ratones db/db y SHBG-db/db. Observamos que los niveles de expresión hepática de genes de vías metabólicas relacionadas con la lipogénesis se encuentran reducidos en los ratones SHBG-db/db comparados con los db/db. De los genes diferencialmente expresados que obtuvimos en el análisis, estudiamos tres enzimas clave en la lipogénesis hepática, ACC, FAS y ACLY [310,357,458-460]. Se ha observado que los ratones deficientes en estas enzimas a nivel hepático están protegidos frente a la ganancia de peso y el desarrollo de esteatosis hepática [458,461-465]. En nuestro estudio, debido a la presencia de SHBG, los ratones machos y hembras SHBG-db/db tienen niveles de ARNm, y de proteína de ACC, FAS y ACLY menores que los ratones db/db. En el modelo de NAFLD inducida por dieta rica en fructosa también los ratones *shbg* muestran niveles reducidos de ARNm y proteína de estas enzimas con respecto a los *wild-type*.

Estos resultados sugieren que la presencia de SHBG reduce la acumulación de grasa en el hígado mediante una disminución en la lipogénesis hepática, lo cual está en concordancia con los estudios que hemos realizados *in vitro*, en células HepG2, en las que el contenido en triglicéridos y los niveles de ANRm de ACC, FAS y ACLY disminuyeron en las células sobreexpresoras de SHBG, mientras que aumentaron en células cuya expresión de SHBG se encontraba silenciada por ARN de interferencia.

Aunque aun no conocemos el mecanismo subyacente a la disminución de la lipogénesis por la SHBG, es posible que el PPAR γ esté implicado en dicho proceso. PPAR γ es, junto con los factores de transcripción SREBP1, ChREBP1 y LXR α , regulador clave de las enzimas lipogénicas [466] y su sobreexpresión en el hígado contribuye al desarrollo de NAFLD [296,467], mientras que su delección en el hígado en modelos murinos de NAFLD produce una mejora en este desorden [468-470]. En nuestros microarrays de tejido hepático el PPAR γ , pero no otros factores de transcripción reguladores de la lipogénesis, como el SREBP o el ChREBP, se encontró disminuido en los ratones SHBG-db/db con respecto a los ratones db/db. La participación de PPAR γ en la modulación de la lipogénesis por la SHBG implicaría una relación bidireccional con la SHBG: por un lado regulando sus niveles [49] y por otro lado siendo regulado por la SHBG. De hecho, hemos observado que los ratones SHBG-db/db por un lado y los ratones *shbg* alimentados con dieta rica en fructosa por otro, presentan niveles de expresión y de proteína de PPAR γ menores que sus homólogos no transgénicos para la *shbg*, de manera que la presencia de SHBG en ellos podría estar reduciendo los niveles de PPAR γ , lo que es acorde con la reducción en lipogénesis y en acumulación hepática de grasa que presentan. Estos resultados preliminares en cuanto al mecanismo anti-lipogénico de la SHBG pueden servir de base para estudiar *in vitro* las posibles vías de acción de la SHBG.

Como conclusión de esta parte del trabajo, nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de SHBG protege frente al desarrollo de NAFLD a través de mecanismos que incluyen la reducción en la lipogénesis a través de una disminución de ACC, FAS y ACLY. Por tanto, nos permite establecer que la SHBG no es sólo un biomarcador de NAFLD, sino que juega un papel activo en el desarrollo y progresión de esta enfermedad. Por ello tiene potencial para utilizarse como terapia para tratar NAFLD, que deberá ser estudiado con más profundidad.

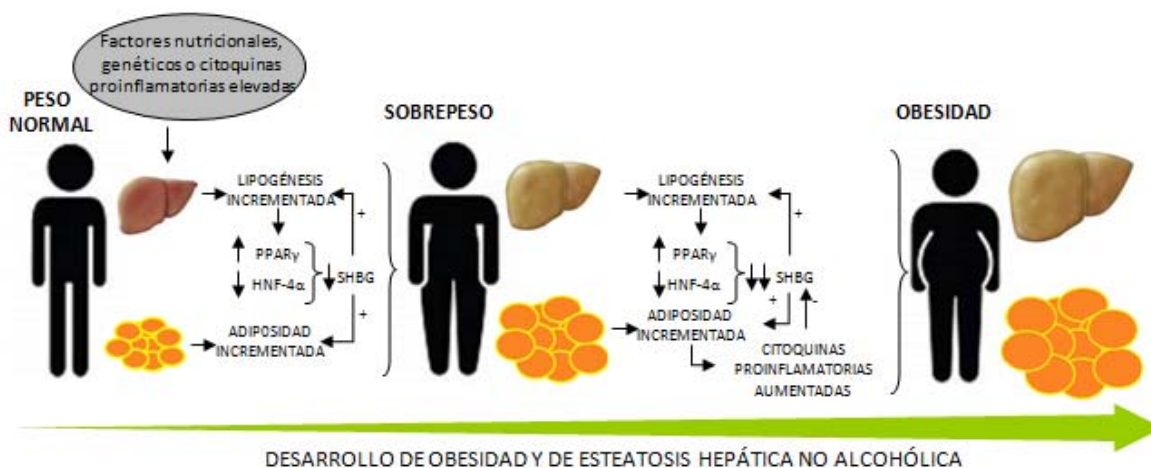


Figura 29. Esquema de los mecanismos moleculares por los que los niveles de SHBG disminuyen y contribuyen al desarrollo de la obesidad y de la NAFLD.

NUEVOS FACTORES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE SHBG

En la búsqueda de nuevos factores que regulan la producción de SHBG se ha tenido en cuenta por un lado el hecho de que enfermedades como la obesidad presenta bajos niveles de SHBG [121-123] y por otro, que estudios epidemiológicos han demostrado que estos niveles bajos de SHBG predicen un mayor riesgo de padecer ECV [145,146].

a) ADIPONECTINA

Ha sido previamente descrito que los pacientes obesos presentan niveles bajos de adiponectina [268,284,285] y que los niveles plasmáticos de SHBG se correlacionan positivamente con los niveles de adiponectina [312,314]. Es importante destacar que esta correlación podría ser indirecta ya que tanto la SHBG como la adiponectina correlacionan negativamente con el IMC [268,316] o bien podría ser que la adiponectina regulara la producción hepática de SHBG. Con la finalidad de esclarecer ésto decidimos realizar estudios *in vitro* utilizando células HepG2, cuyos resultados corresponden al CAPÍTULO II de esta tesis.

El tratamiento a células HepG2 con adiponectina a concentraciones fisiológicas de 25 o 50 ng/ml dio lugar a un incremento de SHBG, tanto en sus niveles de expresión como en la proteína secretada al medio. Puesto que la adiponectina ejerce sus acciones en el hígado a través de su receptor AdipoR2, y éste desencadena una respuesta a través de AMPK [275,471], comprobamos que el activador de AMPK AICAR [472] aumentaba los niveles de SHBG, mientras que el inhibidor de AMPK "compound C" [473] bloqueaba este aumento de SHBG inducido por adiponectina. También pudimos determinar que los niveles proteicos de SHBG y HNF-4 α aumentaron de forma similar en los tratamientos con AICAR y con adiponectina, sin embargo los niveles de expresión de SHBG y HNF-4 α fueron mayores en el tratamiento con adiponectina que con AICAR, sugiriendo que la adiponectina podría estar aumentando la producción de SHBG parcialmente por una vía independiente de AMPK.

Estudios previos han determinado que la adiponectina disminuye la lipogénesis hepática [276,277,471] y aumenta la oxidación de ácidos grasos [275]. En concordancia con estos estudios, el tratamiento a células HepG2 con adiponectina disminuyó los niveles de ARNm y proteína de la enzima lipogénica ACC y aumentó su forma fosforilada p-ACC, que es inactiva, produciendo así una disminución en la lipogénesis. Por otro lado, la adiponectina aumentó los niveles de ARNm y proteína de las enzimas implicadas en oxidación de ácidos grasos, como la CPT-1 y ACOX-1. Esta disminución en enzimas lipogénicas y el aumento en enzimas lipolíticas dio lugar a una reducción en los niveles de triglicéridos hepáticos y ácidos grasos libres en las células tratadas con adiponectina. Estos resultados confirman lo que ya se había observado previamente [474,475] y proporcionan las pruebas a nivel

molecular que apoyan la relación inversa entre la adiponectina y el desarrollo de NAFLD. En un estudio multiétnico ese observó que los niveles de adiponectina se encuentran inversamente asociados al desarrollo de NAFLD, incluso después de las correcciones por sensibilidad a la insulina, adiposidad abdominal extrahepática y etnia [476]; otro estudio observacional determinó que los niveles de adiponectina en pacientes con obesidad severa muestran una correlación negativa con el grado de NAFLD expresado en “NAS” (NAFLD activity score) [477].

Nuestros resultados también coinciden con aquéllos obtenidos en la caracterización del ratón KO para adiponectina, en el que los niveles de triglicéridos hepáticos están aumentados con respecto al ratón *wild-type* [478]. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos por Liu y col., en los que el ratón KO de adiponectina tiene niveles bajos tanto de enzimas β -oxidativas como de enzimas lipogénicas [479]. Así bien, la carencia de adiponectina en este modelo de ratón da lugar a una disminución generalizada de enzimas hepáticas y a un desequilibrio que generaría la resistencia a la insulina que se produce en condiciones de adiponectina plasmática baja, como la obesidad.

El contenido de grasa hepática, pero no la grasa corporal total ni la grasa visceral constituyen un factor predictivo independiente de los niveles plasmáticos de SHBG [131]. Además, en un estudio llevado a cabo por Stefan y col., después de una intervención dietética el incremento en los niveles de SHBG se asoció con una reducción de grasa hepática [132]. En concordancia con este resultado en humanos, Selva y col. llevaron a cabo experimentos utilizando células HepG2 y el ratón transgénico para la SHBG en las que se analizaron los mecanismos moleculares por los que una modulación de la lipogénesis regularía la producción de SHBG hepática [193]. El palmitato exógeno y endógeno procedente de la lipogénesis *de novo* reduce la producción de SHBG mediante la inhibición de HNF-4 α , mientras que las hormonas tiroideas aumentan la producción de SHBG induciendo la oxidación de ácidos grasos, que da lugar a una reducción del contenido lipídico en el hígado y a un aumento en los niveles de HNF-4 α [193,231]. En estos estudios observamos una modulación en los niveles de HNF-4 α dependiendo del contenido hepático de grasa, bien por un aumento en la lipogénesis hepática [193] o en la β -oxidación [231].

En base a estos resultados previos, decidimos estudiar si el tratamiento con adiponectina aumenta los niveles de HNF-4 α en nuestro sistema *in vitro*. En nuestros resultados, observamos que efectivamente, los niveles de HNF-4 α aumentaron con los tratamientos de adiponectina y AICAR, mientras que disminuyeron con el “compound C”. El incremento en la producción de SHBG inducido por adiponectina quedó bloqueado cuando las HepG2 fueron transfectadas con un ARN de interferencia que silenció la expresión de HNF-4 α . Además, el efecto inductor de la adiponectina

sobre la SHBG y sobre el HNF-4 α se perdió mediante la inducción de lipogénesis por glucosa o el bloqueo de la β -oxidación con etomoxir.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Liu Q y col., que observaron que la adiponectina regula los niveles HNF-4 α en el ratón KO para adiponectina. En este modelo de ratón determinaron que había una reducción en la unión de HNF-4 α a sus genes diana [479]. Sin embargo, nuestros resultados son contrarios a los obtenidos por Neumeier y col., que encontraron que la adiponectina de alto peso molecular reducía los niveles de HNF-4 α en cultivos primarios de hepatocitos humanos [480]. Estas diferencias en los resultados pueden explicarse por las condiciones de sus estudios: tanto en la duración (24 horas frente a 3 días), como en la utilización de medio deplecionado de suero y en la concentración de adiponectina, ya que mientras en nuestro estudio se utiliza una concentración fisiológica (50 ng/ml), en su estudio realizan el tratamiento con una concentración de adiponectina mucho más alta, de 200 μ g/ml.

En nuestro trabajo encontramos una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de SHBG y adiponectina en una muestra de 14 hombres obesos, con un rango de IMC entre 32.61–52.31 kg/m², al igual que en estudios previos [311,313,314]. También encontramos que los niveles de expresión de adiponectina se correlacionaron de forma positiva con los niveles de expresión de SHBG y HNF-4 α en biopsias hepáticas de estos pacientes. Estos resultados sugieren que los mecanismos moleculares que hemos encontrado *in vitro* podrían ocurrir en humanos.

Nuestros resultados en torno a la regulación de la SHBG por adiponectina dan pie a estudiar más a fondo la relación entre adiponectina, SHBG, enfermedad de hígado graso y riesgo cardiovascular. Además, en el marco de regulación de SHBG por factores metabólicos, con base en estos resultados, resultaría de interés estudiar si la adipoquina CTRP3, parálogo de la adiponectina [481] juega asimismo un papel en la regulación de la SHBG. CTRP3 ha sido descrita, de forma similar a la adiponectina, como reductor de trigliceridemia, reductor de síntesis de triglicéridos o protector frente a la NAFLD [482,483]. Además, como la adiponectina, sus niveles se relacionan de forma inversa con el IMC o los triglicéridos y positivamente con la edad y con la misma adiponectina [484] y ejerce varias de sus acciones a través de AMPK [485].

Por otro lado, nuestros resultados tienen potenciales implicaciones clínicas: sugieren que la reducción de los niveles plasmáticos de adiponectina que ocurre en la obesidad estaría implicada en los mecanismos moleculares que reducen la expresión de la SHBG en esta enfermedad, como sería el caso de otras adipoquinas como TNF α e IL-1 β , que se encuentran elevadas en pacientes obesos [259,323,486] y que son responsables también de los bajos niveles plasmáticos de SHBG que presentan estos pacientes [194,207,208]. Los pacientes obesos también presentan niveles bajos de

testosterona, lo que podría estar afectando a los niveles de adiponectina. De hecho, nuestros resultados pueden explicar el hecho de que las mujeres presenten niveles plasmáticos de SHBG más elevados que los hombres. Tradicionalmente se ha postulado que esto ocurre porque el estradiol aumenta la producción hepática de la SHBG mientras que la testosterona la inhibe. Sin embargo, en distintos experimentos, como ya adelantaba en la introducción, esto no ha sido esclarecido, ni se han propuesto mecanismos moleculares que lo expliquen, además en el promotor de la SHBG no se han encontrado elementos de respuesta a andrógenos. Nishizawa y col. han demostrado *in vivo* e *in vitro* que la testosterona reduce la producción de adiponectina plasmática en ratones o secretada al medio en cultivo de adipocitos [487], por tanto, es posible que la testosterona pueda regular la producción de SHBG de forma indirecta, mediante la reducción de los niveles de adiponectina. Por consiguiente, el hecho de que las mujeres tengan niveles plasmáticos de adiponectina más elevados que los hombres [488] podría explicar que sus niveles de SHBG plasmáticos sean más elevados que los de los hombres.

Finalmente, los resultados de este estudio pueden servir de base para desarrollar nuevas terapias dirigidas a aumentar los niveles de SHBG y testosterona mediante el aumento de los niveles de adiponectina.

b) ÁCIDO OLEICO

Estudios epidemiológicos han descrito que niveles bajos de SHBG predicen un mayor riesgo de desarrollar ECV [145,146]. Por otro lado, está ampliamente aceptado que la Dieta Mediterránea reduce el riesgo de padecer ECV [401,404,489]. El hecho de que varios estudios han comprobado que la SHBG sufre una importante regulación nutricional [210,490,491] nos lleva a plantearnos si algún elemento de la dieta Mediterránea podría estar regulando los niveles plasmáticos de SHBG, ya que varios estudios intervencionales también han vinculado las características nutricionales de la dieta Mediterránea con niveles elevados de SHBG [211,212,492]. Uno de los componentes más importantes de la Dieta Mediterránea es el aceite de oliva, cuyo compuesto principal es el ácido oleico.

El ácido oleico es un MUFA. En 2004, la FDA estableció la conveniencia de consumir MUFA del aceite de oliva por la reducción que se había observado en el riesgo de sufrir ECV [493]. En un estudio griego llevado a cabo con 28.572 individuos, se encontró una correlación negativa entre este ratio MUFAs/SFAs y la mortalidad por ECV [402] y en otro estudio español, se encontró que el riesgo de sufrir el primer infarto de miocardio se asoció negativamente con el consumo de aceite de oliva [411]. Además, otros ácidos grasos como el palmitato son capaces de regular la producción de la

SHBG [193]. Con estas evidencias nos planteamos si el ácido oleico podría ser un regulador de la SHBG. Los resultados de este estudio corresponden al CAPÍTULO IV de esta tesis y serán discutidos a continuación.

En primer lugar, en colaboración con el grupo de investigación en Endocrinología y Nutrición del Hospital Carlos Haya de Málaga, hemos llevado a cabo en el marco del estudio *PIZARRA* [494], una estimación de la relación entre los niveles plasmáticos de SHBG y el consumo de aceite de oliva en un estudio observacional realizado durante 6 años en el que un grupo de hombres consumió y cocinó con aceite de oliva y otro grupo de hombres lo hizo con otros tipos de aceites ricos en ácido linoleico. En el estudio *PIZARRA* ya se había observado una asociación negativa entre los niveles plasmáticos de SHBG y el riesgo de sufrir DM2, obesidad y resistencia a la insulina [495]. Hemos comprobado que la población que cocinó con aceite de oliva tenía niveles plasmáticos de SHBG mayores que los de aquellos hombres que cocinaron con otros tipos de aceite. Además, tanto los niveles de MUFAs como los de SHBG fueron significativamente mayores en los consumidores de aceite de oliva para cocinar con respecto a los que usaron otros tipos de aceite. Como ya estaba descrito en la literatura, se observó que los niveles de SHBG plasmática de los hombres que participaron en el estudio se correlacionaron positivamente con la edad [217,496] y negativamente con el IMC [122]. Finalmente, la SHBG plasmática se correlacionó positivamente con el porcentaje de MUFAs y negativamente con los SFAs del plasma. Sin embargo, no se encontró correlación entre los niveles plasmáticos de SHBG y los PUFAs. Nuestros resultados discrepan con los obtenidos por Nayeem y col., donde se describió una correlación positiva entre los niveles de SHBG y el consumo diario de ácido linoleico en 255 mujeres sanas premenopáusicas [497].

La composición de los ésteres de colesterol y fosfolípidos del suero refleja tanto los ácidos grasos ingeridos con la dieta, como la síntesis de ácidos grasos endógenos. En este sentido, las enzimas desaturasas tienen un papel importante en la composición de los ácidos grasos circulantes. La SCD-1, que cataliza la formación de ácido oleico (18:1) a partir de ácido estearico (18:0) y la formación de palmitoleico (16:1) a partir de ácido palmítico (16:0), es la enzima limitante en la biosíntesis de MUFAs [498] y el ratio entre el ácido oleico y el estearico constituye un marcador de su actividad bastante fiable [498], ya que su medida directa resulta complicada [499]. En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de SHBG se correlacionan positivamente con el ratio oleico/estearico, sugiriendo una posible relación entre la actividad de la SCD-1 y la SHBG. Por lo tanto, a mayor actividad de SCD-1 mayores niveles de SHBG. Esto está en contraposición a estudios que muestran una relación positiva entre la actividad de la SCD-1 y obesidad o resistencia a la insulina [500] y con el hecho de que los ratones deficientes en SCD-1 son resistentes a la obesidad inducida por dietas ricas en carbohidratos y a los efectos deletéreos de los SFAs [501]. Estos

resultados tampoco concuerdan con el hecho de que existan niveles bajos de SHBG en pacientes obesos. Estas divergencias pueden explicarse puesto que se ha demostrado que el ratio oleico/esteraico sobrestima la actividad de la SCD-1 en sujetos con un alto consumo de ácido oleico [502,503], por tanto, para interpretar la relación positiva entre la actividad de la SCD-1 y la SHBG, debe tenerse en cuenta el consumo de MUFAs, como el ácido oleico del aceite de oliva en personas cuyo consumo sea elevado.

A continuación, decidimos comprobar si el ácido oleico aumenta los niveles de SHBG *in vitro*. Para ello, utilizamos células HepG2 y las tratamos diariamente con ácido oleico (oleil-coenzima A) durante tres días a concentración 100 μ M. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de SHBG secretada al medio en comparación con el tratamiento con ácido linoleico (linoleil-coenzima A) a 100 μ M o vehículo (PBS). Con la finalidad de determinar el mecanismo molecular por el que el ácido oleico aumenta la SHBG quisimos determinar los niveles de HNF-4 α y PPAR γ , factores de transcripción muy importantes que regulan la SHBG. Los resultados mostraron que el factor de transcripción responsable de la modulación en la producción de SHBG por ácido oleico es el PPAR γ , cuyos niveles de ARNm y de proteína se encontraron disminuidos en el tratamiento con oleil-coenzima A en comparación con los tratamientos con linoleil-coenzima A y vehículo. No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm y proteína de HNF-4 α entre los tratamientos. Mediante un ensayo ChIP comprobamos que la unión de PPAR γ al promotor de la SHBG en las células tratadas con oleil-coenzima A fue menor que en las células tratadas con linoleil-coenzima A, mientras que la unión de HNF-4 α a su promotor fue mayor en el tratamiento con oleil-coenzima A, explicado así el aumento de la expresión y producción de SHBG. Estudios previos ya habían demostrado la regulación de la SHBG por ácidos grasos. En concreto, Selva y col. demostraron que el tratamiento con palmitoil-coenzima A reducía los niveles de SHBG mediante la disminución de los niveles de HNF-4 α [193].

Diferentes estudios en los que se utilizan líneas celulares muestran resultados conflictivos con respecto a los encontrados en nuestro estudio. En uno de ellos se describe que el ácido oleico produce un aumento en los niveles de PPAR γ en HepG2 y otras líneas celulares hepáticas como WRL-68 o HuH7 [504] o en células hepáticas no parenquimales "NMuLi" [505], lo que va ligado a un efecto esteatótico del ácido oleico, aumentando los niveles de triglicéridos hepáticos [504] o los niveles de factores lipogénicos como ADRP (adipogenic differentiation-related protein) [505]. Tales resultados pueden deberse por una parte a una diferencia en las condiciones experimentales, que difieren en las concentraciones de ácido oleico utilizadas, entre 6 y 12 veces mayores que las usadas en nuestro experimento y en un mayor tiempo de tratamiento [504], así como al uso de otras líneas celulares y a la conjugación del ácido oleico con BSA en lugar de coenzima A [505], lo cual permite su unión a las

membranas y un menor control de la cantidad de ácido oleico recibido por la célula. Además, el tratamiento con ácido oleico se ha utilizado como inductor de NAFLD [506-508], en concentraciones superiores a la usada por nosotros (entre 5 y 30 veces mayores) y superiores también a la correspondiente a un consumo recomendado de aceite de oliva [509].

Desconocemos el mecanismo molecular por el cual el ácido oleico disminuye los niveles de PPAR γ . Previamente se ha descrito que los miembros de la familia PPAR son receptores de ácidos grasos [510-512] y que pueden unirse a ellos a concentraciones del orden de micromolar [512]. Se ha descrito una especial preferencia de unión del PPAR γ a PUFAs [513] y del PPAR α a SFAs y MUFAs [514], aunque los diferentes ácidos grasos pueden actuar como ligandos para el resto de PPARs [505,512]. Sería posible que al PPAR γ se uniese el ácido oleico y el PPAR γ fuera degradado más rápidamente, lo que explicaría la disminución de sus niveles proteicos. El PPAR γ se autoregula, y por tanto esta disminución en los niveles proteicos comportaría también la disminución de su ARNm. Por otra parte, numerosos estudios muestran un efecto protector del aceite de oliva frente a la esteatosis hepática en modelos *in vivo* [515-517] y en humanos. Está también descrito que el consumo de aceite de oliva produce una disminución en la acumulación hepática de lípidos [518,519], a través de un aumento en la β -oxidación mediante la activación del PPAR α o por una disminución de genes lipogénicos a través de la inhibición de factores reguladores de la lipogénesis, como es el SREBP [518]. Esta protección que confiere el aceite de oliva frente a la acumulación hepática de lípidos se ha atribuido a su alto contenido en MUFAs, ya que el ácido oleico (que constituye aproximadamente un 70% de los ácidos grasos del aceite de oliva) es capaz de reducir la lipogénesis en el hígado [520] y en otros tejidos con alta capacidad lipogénica [521-523]. Nuestros resultados sugieren que la disminución en la lipogénesis producida por el ácido oleico podría darse por la disminución en los niveles de PPAR γ , ya que está descrito que este factor de transcripción regula varias enzimas lipogénicas [466]. Sin embargo, también hay estudios en modelos animales mostrando que el consumo de ácido oleico y de aceite de oliva aumenta la actividad de las enzimas lipogénicas ACC y FAS [524-526]. Otros muestran la ausencia de efecto del ácido oleico sobre la lipogénesis hepática [527,528]. Estos datos aparentemente contradictorios podrían depender de varios factores diferenciales entre los estudios como pueden ser el modelo animal, la cantidad y calidad del aceite de oliva administrado o de los grupos control utilizados [509].

Como conclusión de esta última parte, en este estudio identificamos otro factor nutricional capaz de aumentar los niveles de SHBG, el ácido oleico, consistente con lo observado anteriormente con respecto a la relación positiva entre el consumo de Dieta Mediterránea y niveles elevados de SHBG plasmática. En este sentido, el consumo de aceite de oliva está asociado con un aumento en los niveles de SHBG, lo cual está producido por la reducción de los niveles de PPAR γ que induce el

ácido oleico. Puesto que el aceite de oliva es uno de los componentes principales de la Dieta Mediterránea y los niveles de SHBG están asociados con un menor riesgo de sufrir ECV, es plausible que exista una relación entre el papel de la SHBG y el consumo de aceite de oliva en cuanto a sus efectos cardioprotectores.

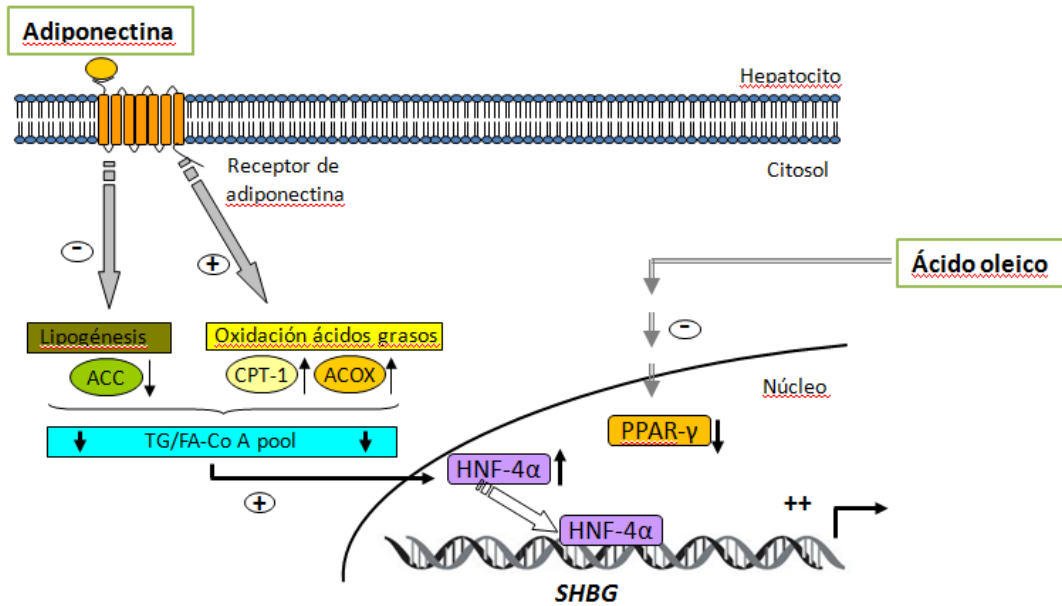


Figura 30. Mecanismos moleculares por los que la adiponectina y el ácido oleico incrementan la producción hepática de SHBG.

CONCLUSIONES

1. Hemos desarrollado el primer modelo de ratón transgénico que expresa SHBG y desarrolla obesidad, DMT2 y NAFLD. Estos ratones se comportan como los humanos en relación a la reducción de SHBG y testosterona durante el desarrollo de estas enfermedades.
2. La producción de SHBG está reducida en ratones obesos y diabéticos SHBG-db/db en comparación con los ratones delgados SHBG-db/+. Esta reducción se debe a una disminución en los niveles hepáticos del factor de transcripción HNF-4 α y un aumento en los niveles hepáticos de PPAR γ .
3. En biopsias hepáticas humanas de sujetos obesos, los niveles de expresión de SHBG se correlacionan positivamente con los de HNF-4 α y negativamente con los de PPAR γ .
4. El tratamiento con adiponectina a dosis fisiológicas aumenta los niveles de expresión y proteína de SHBG en células HepG2. Este incremento ocurre a través de un aumento en los niveles de expresión y proteína de HNF-4 α , producidos por una activación de la AMPK inducida por la adiponectina, que provoca un aumento en la lipólisis y una disminución en la lipogénesis.
5. En pacientes obesos, los niveles plasmáticos de adiponectina se correlacionan con los niveles plasmáticos de SHBG y con los niveles de expresión hepática de HNF-4 α , que a su vez correlacionan con los niveles de expresión hepática de SHBG.
6. El consumo de aceite de oliva aumenta los niveles plasmáticos de SHBG y de MUFAs con respecto al consumo de otros tipos de aceite en hombres.
7. El tratamiento con ácido oleico aumenta los niveles de expresión y proteína de SHBG en la línea celular hepática HepG2 a través de la disminución de los niveles de expresión y proteína de PPAR γ , mientras que los niveles de HNF-4 α no se ven afectados por el tratamiento.
8. El aumento en los niveles de SHBG producido por el ácido oleico podría tener un papel en el efecto cardioprotector del aceite de oliva.

BIBLIOGRAFÍA

1. Peters T, Jr. Serum albumin. **Adv Protein Chem** 1985; 37:161-245.
2. Wilson JD, Griffin JE, George FW. Sexual differentiation: early hormone synthesis and action. **Biol Reprod** 1980; 22(1):9-17.
3. Que BG, Petra PH. Characterization of a cDNA coding for sex steroid-binding protein of human plasma. **FEBS Lett** 1987; 219(2):405-409.
4. Gershagen S, Lundwall A, 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(22):9245-9258.
5. Khan MS, Knowles BB, Aden DP, Rosner W. Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by a human hepatoma-derived cell line. **J Clin Endocrinol Metab** 1981; 53(2):448-449.
6. Kato T, Horton R. Studies of testosterone binding globulin. **J Clin Endocrinol Metab** 1968; 28(8):1160-1168.
7. Lea OA, Stoa KF. The binding of testosterone to different serum proteins: a comparative study. **J Steroid Biochem** 1972; 3(3):409-419.
8. 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(12):1399-1403.
9. Rosner W, Deakins SM. Testosterone-binding globulins in human plasma: studies on sex distribution and specificity. **J Clin Invest** 1968; 47(9):2109-2116.
10. Vermeulen A, Verdonck L. Studies on the binding of testosterone to human plasma. **Steroids** 1968; 11(5):609-635.
11. Mendel CM. Rates of dissociation of sex steroid hormones from human sex hormone-binding globulin: a reassessment. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1990; 37(2):251-255.
12. Pearlman WH, Crepy O. Steroid-protein interaction with particular reference to testosterone binding by human serum. **J Biol Chem** 1967; 242(2):182-189.
13. Hammond GL. Potential functions of plasma steroid-binding proteins. **Trends Endocrinol Metab** 1995; 6(9-10):298-304.
14. Selby C. Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance. **Ann Clin Biochem** 1990; 27 (Pt 6):532-541.
15. Corvol P, Bardin CW. Species distribution of testosterone-binding globulin. **Biol Reprod** 1973; 8(3):277-282.
16. Renoir JM, Mercier-Bodard C, Baulieu EE. Hormonal and immunological aspects of the phylogeny of sex steroid binding plasma protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1980; 77(8):4578-4582.
17. Wenn RV, Kamberi IA, Keyvanjah M, Johannes A. Distribution of testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) in the higher vertebrates. **Endokrinologie** 1977; 69(2):151-156.
18. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. **Recent Prog Horm Res** 1982; 38:457-510.
19. Rosner W, Darmstadt RA. Demonstration and partial characterization of a rabbit serum protein which binds testosterone and dihydrotestosterone. **Endocrinology** 1973; 92(6):1700-1707.
20. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. **Endocr Rev** 1989; 10(3):232-274.
21. Adams JS. "Bound" to work: the free hormone hypothesis revisited. **Cell** 2005; 122(5):647-649.
22. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, et al. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. **Cell** 2005; 122(5):751-762.
23. Nagai J, Christensen EI, Morris SM, Willnow TE, Cooper JA, Nielsen R. Mutually dependent localization of megalin and Dab2 in the renal proximal tubule. **Am J Physiol Renal Physiol** 2005; 289(3):F569-576.
24. Gekle M. Renal tubule albumin transport. **Annu Rev Physiol** 2005; 67:573-594.

25. Adams JS, Chen H, Chun R, et al. Response element binding proteins and intracellular vitamin D binding proteins: novel regulators of vitamin D trafficking, action and metabolism. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2004; 89-90(1-5):461-465.
26. Soccio RE, Breslow JL. Intracellular cholesterol transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2004; 24(7):1150-1160.
27. Hammond GL, Underhill DA, Rykse HM, Smith CL. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. **Mol Endocrinol** 1989; 3(11):1869-1876.
28. Nakhla AM, Hryb DJ, Rosner W, Romas NA, Xiang Z, Kahn SM. Human sex hormone-binding globulin gene expression- multiple promoters and complex alternative splicing. **BMC Mol Biol** 2009; 10:37.
29. Pinos 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; 10:59.
30. Sullivan PM, Petrusz P, Szpirer C, Joseph DR. 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(1):143-154.
31. Danzo BJ, Black JH, Bell BW. Analysis of the oligosaccharides on androgen-binding proteins: implications concerning their role in structure/function relationships. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1991; 40(4-6):821-831.
32. Joseph DR. Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. **Vitam Horm** 1994; 49:197-280.
33. 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(8-9):578-588.
34. Gunsalus GL, Larrea F, Musto NA, Becker RR, Mather JP, Bardin CW. Androgen binding protein as a marker for Sertoli cell function. **J Steroid Biochem** 1981; 15:99-106.
35. 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(6):4462-4468.
36. Janne M, Deol HK, Power SG, Yee SP, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice. **Mol Endocrinol** 1998; 12(1):123-136.
37. Janne M, Hogeveen KN, Deol HK, Hammond GL. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. **Endocrinology** 1999; 140(9):4166-4174.
38. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. **J Endocrinol** 2002; 175(1):113-120.
39. Bocchinfuso WP, Hammond GL. Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin partially overlap: steroids and Ca²⁺ stabilize dimer formation. **Biochemistry** 1994; 33(35):10622-10629.
40. Bocchinfuso WP, Warmels-Rodenhiser S, Hammond GL. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis. **FEBS Lett** 1992; 301(2):227-230.
41. Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. **Embo J** 2000; 19(4):504-512.
42. Sui LM, Cheung AW, Namkung PC, Petra PH. 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(2):115-118.
43. Khan MS, Hryb DJ, Hashim GA, Romas NA, Rosner W. Delineation and synthesis of the membrane receptor-binding domain of sex hormone-binding globulin. **J Biol Chem** 1990; 265(30):18362-18365.

44. Petra PH, Griffin PR, Yates JR, 3rd, Moore K, Zhang W. 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(7):902-909.
45. Walsh KA, Titani K, Takio K, Kumar S, Hayes R, Petra PH. Amino acid sequence of the sex steroid binding protein of human blood plasma. **Biochemistry** 1986; 25(23):7584-7590.
46. Janne 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(51):34105-34114.
47. Simo R, Saez-Lopez C, Barbosa-Desongles A, Hernandez C, Selva DM. Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. **Trends Endocrinol Metab** 2015; 26(7):376-383.
48. Leng X, Cooney AJ, Tsai SY, Tsai MJ. Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression. **Mol Cell Biol** 1996; 16(5):2332-2340.
49. Selva DM, Hammond GL. Peroxisome-proliferator receptor gamma represses hepatic sex hormone-binding globulin expression. **Endocrinology** 2009; 150(5):2183-2189.
50. Hammond GL. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. **Biol Reprod** 2011; 85(3):431-441.
51. 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(39):36383-36390.
52. Selva DM, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin is expressed in testicular germ cells and not in sertoli cells. **Horm Metab Res** 2006; 38(4):230-235.
53. Selva DM, Hogeveen KN, Seguchi K, Tekpetey F, Hammond GL. A human sex hormone-binding globulin isoform accumulates in the acrosome during spermatogenesis. **J Biol Chem** 2002; 277(47):45291-45298.
54. Hammond GL, Bocchinfuso WP. Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses. **Horm Res** 1996; 45(3-5):197-201.
55. 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(11):6275-6282.
56. 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(29):26618-26622.
57. Larrea F, Diaz L, Carino C, et al. Evidence that human placenta is a site of sex hormone-binding globulin gene expression. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1993; 46(4):497-505.
58. Misao R, Itoh N, Mori H, Fujimoto J, Tamaya T. Sex hormone-binding globulin mRNA levels in human uterine endometrium. **Eur J Endocrinol** 1994; 131(6):623-629.
59. Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J, Tamaya T. Expression of sex hormone-binding globulin mRNA in uterine leiomyoma, myometrium and endometrium of human subjects. **Gynecol Endocrinol** 1995; 9(4):317-323.
60. Huang R, Ma Y, Holm R, Trope CG, Nesland JM, Suo Z. Sex hormone-binding globulin (SHBG) expression in ovarian carcinomas and its clinicopathological associations. **PLoS One** 2013; 8(12):e83238.
61. Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Tamaya T. Expression of sex hormone-binding globulin mRNA in human ovarian cancers. **Eur J Endocrinol** 1995; 133(3):327-334.
62. Porto CS, Musto NA, Bardin CW, Gunsalus GL. Binding of an extracellular steroid-binding globulin to membranes and soluble receptors from human breast cancer cells (MCF-7 cells). **Endocrinology** 1992; 130(5):2931-2936.
63. Noe G. Sex hormone binding globulin expression and colocalization with estrogen receptor in the human Fallopian tube. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1999; 68(3-4):111-117.
64. Schock HW, Herbert Z, Sigusch H, Figulla HR, Jirikowski GF, Lotze U. Expression of androgen-binding protein (ABP) in human cardiac myocytes. **Horm Metab Res** 2006; 38(4):225-229.

65. Fassler R, Schwarz S, Pohl P. Demonstration of sex hormone binding globulin in human cerebrospinal fluid. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1985; 23(4):349-359.
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(4):603-608.
67. Plymate SR, Loop SM, Hoop RC, et al. Effects of sex hormone binding globulin (SHBG) on human prostatic carcinoma. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1991; 40(4-6):833-839.
68. Avvakumov GV, Matveentseva IV, Akhrem LV, Strel'chyonok OA, Akhrem AA. Study of the carbohydrate moiety of human serum sex hormone-binding globulin. **Biochim Biophys Acta** 1983; 760(1):104-110.
69. 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(1):100-104.
70. Avvakumov GV, Cherkasov A, Muller YA, Hammond GL. Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. **Mol Cell Endocrinol** 2010; 316(1):13-23.
71. Rudenko G, Nguyen T, Chelliah Y, Sudhof TC, Deisenhofer J. The structure of the ligand-binding domain of neurexin Ibeta: regulation of LNS domain function by alternative splicing. **Cell** 1999; 99(1):93-101.
72. Hildebrand C, Bocchinfuso WP, Dales D, Hammond GL. Resolution of the steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin by expression in *Escherichia coli*. **Biochemistry** 1995; 34(10):3231-3238.
73. Avvakumov GV, 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(34):25920-25925.
74. Hammond GL, Robinson PA, Sugino H, Ward DN, Finne J. Physicochemical characteristics of human sex hormone binding globulin: evidence for two identical subunits. **J Steroid Biochem** 1986; 24(4):815-824.
75. Westphal U. Steroid-protein interactions II. **Monogr Endocrinol** 1986; 27:1-603.
76. Hammond GL. Extracellular steroid-binding proteins. **Parker, M. (ed.), Steroid Hormone Action** 1993:1-25.
77. Sui LM, Hughes W, Hoppe AJ, Petra PH. 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(12):2514-2520.
78. Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Hammond GL, Catalano MG, Muller YA. Steroid ligands bind human sex hormone-binding globulin in specific orientations and produce distinct changes in protein conformation. **J Biol Chem** 2002; 277(35):32086-32093.
79. 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(2):333-348.
80. Cousin P, Dechaud H, Grenot C, Lejeune H, Pugeat M. 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(1):235-240.
81. Strel'chyonok OA, Avvakumov GV. Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: novel data on their structure and function. **J Steroid Biochem** 1990; 35(5):519-534.
82. Raineri M, Catalano MG, Hammond GL, Avvakumov GV, Frairia R, Fortunati N. O-Glycosylation of human sex hormone-binding globulin is essential for inhibition of estradiol-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation. **Mol Cell Endocrinol** 2002; 189(1-2):135-143.
83. He X, Shen L, Malmborg AC, Smith KJ, Dahlback B, Linse S. Binding site for C4b-binding protein in vitamin K-dependent protein S fully contained in carboxy-terminal laminin-G-type repeats. A study using recombinant factor IX-protein S chimeras and surface plasmon resonance. **Biochemistry** 1997; 36(12):3745-3754.

84. Mark MR, Chen J, Hammonds RG, Sadick M, Godowsk PJ. Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. **J Biol Chem** 1996; 271(16):9785-9789.
85. Joseph DR, O'Brien DA, Sullivan PM, Becchis M, Tsuruta JK, Petrusz P. Overexpression of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in male transgenic mice: tissue distribution and phenotypic disorders. **Biol Reprod** 1997; 56(1):21-32.
86. Mahoney PA, Weber U, Onofrechuk P, Biessmann H, Bryant PJ, Goodman CS. The fat tumor suppressor gene in *Drosophila* encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. **Cell** 1991; 67(5):853-868.
87. Rosner W, Hryb DJ, Kahn SM, Nakhla AM, Romas NA. Interactions of sex hormone-binding globulin with target cells. **Mol Cell Endocrinol** 2010; 316(1):79-85.
88. Strel'chyonok OA, Avvakumov GV, Survilo LI. A recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes. **Biochim Biophys Acta** 1984; 802(3):459-466.
89. Hryb DJ, Khan MS, Rosner W. Testosterone-estradiol-binding globulin binds to human prostatic cell membranes. **Biochem Biophys Res Commun** 1985; 128(1):432-440.
90. Avvakumov GV, Survilo LI, Strel'chenok OA. [Interaction of blood sex steroid-binding globulin with cell membranes of human decidual tissue]. **Biokhimiia** 1985; 50(7):1155-1161.
91. Frairia R, Fortunati N, Berta L, Fazzari A, Fissore F, Gaidano G. Sex steroid binding protein (SBP) receptors in estrogen sensitive tissues. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1991; 40(4-6):805-812.
92. Fortunati N, Becchis M, Fissore F, et al. The hepatic receptor for sex steroid-binding protein: study on a non-malignant cell line (Chang liver). **J Mol Endocrinol** 1993; 11(3):257-264.
93. Krupenko SA, Krupenko NI, Danzo BJ. Interaction of sex hormone-binding globulin with plasma membranes from the rat epididymis and other tissues. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1994; 51(1-2):115-124.
94. Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. **J Biol Chem** 1990; 265(11):6048-6054.
95. Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. Solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate. **J Biol Chem** 1989; 264(10):5378-5383.
96. Nakhla AM, Khan MS, Rosner W. Biologically active steroids activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LNCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate. **J Clin Endocrinol Metab** 1990; 71(2):398-404.
97. Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. Androgens, estrogens, and second messengers. **Steroids** 1998; 63(5-6):278-281.
98. Tadokoro T, Rouzaud F, Itami S, Hearing VJ, Yoshikawa K. The inhibitory effect of androgen and sex-hormone-binding globulin on the intracellular cAMP level and tyrosinase activity of normal human melanocytes. **Pigment Cell Res** 2003; 16(3):190-197.
99. Nakhla AM, Leonard J, Hryb DJ, Rosner W. Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. **Steroids** 1999; 64(3):213-216.
100. Nakhla AM, Rosner W. Stimulation of prostate cancer growth by androgens and estrogens through the intermediacy of sex hormone-binding globulin. **Endocrinology** 1996; 137(10):4126-4129.
101. Frairia R, Fortunati N, Fazzari A, et al. Sex steroid binding protein is a negative modulator of estrogen-induced breast cancer cell growth. **Ann N Y Acad Sci** 1996; 784:362-369.
102. Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, et al. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). **J Histochem Cytochem** 1994; 42(4):531-542.
103. Pope SN, Lee IR. Yeast two-hybrid identification of prostatic proteins interacting with human sex hormone-binding globulin. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2005; 94(1-3):203-208.

104. Sanchez WY, de Veer SJ, Swedberg JE, et al. Selective cleavage of human sex hormone-binding globulin by kallikrein-related peptidases and effects on androgen action in LNCaP prostate cancer cells. **Endocrinology** 2012; 153(7):3179-3189.
105. Ng KM, Catalano MG, Pinos T, et al. Evidence that fibulin family members contribute to the steroid-dependent extravascular sequestration of sex hormone-binding globulin. **J Biol Chem** 2006; 281(23):15853-15861.
106. Sendemir A, Sendemir E, Kosmehl H, Jirikowski GF. Expression of sex hormone-binding globulin, oxytocin receptor, caveolin-1 and p21 in leiomyoma. **Gynecol Endocrinol** 2008; 24(2):105-112.
107. Majdic G, Saunders PT, 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 independent of LH action. **Biol Reprod** 1998; 58(2):520-525.
108. 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(4):1965-1972.
109. Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. **Endocr Rev** 2009; 30(7):883-925.
110. Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1974; 3(1):69-96.
111. Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M, Dewailly D, Soudan B, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. **J Clin Invest** 2002; 109(7):973-981.
112. Kouretas D, Laliotis V, Taitzoglou I, et al. Sex-hormone binding globulin from sheep serum: purification and effects of pregnancy and treatment with exogenous estradiol. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol** 1999; 123(3):233-239.
113. Leger J, Forest MG, Czernichow P. Thyroid hormones influences sex steroid binding protein levels in infancy: study in congenital hypothyroidism. **J Clin Endocrinol Metab** 1990; 71(5):1147-1150.
114. Elmlinger MW, Kuhnel W, Ranke MB. Reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults. **Clin Chem Lab Med** 2002; 40(11):1151-1160.
115. Apter D, Bolton NJ, Hammond GL, Vihko R. Serum sex hormone-binding globulin during puberty in girls and in different types of adolescent menstrual cycles. **Acta Endocrinol (Copenh)** 1984; 107(3):413-419.
116. De Sanctis V, Vullo C, Katz M, Wonke B, Nannetti C, Bagni B. Induction of spermatogenesis in thalassaemia. **Fertil Steril** 1988; 50(6):969-975.
117. 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(2):510-512.
118. Hammond GL, Langley MS, Robinson PA. A liquid-phase immunoradiometric assay (IRMA) for human sex hormone binding globulin (SHBG). **J Steroid Biochem** 1985; 23(4):451-460.
119. Toscano V, Balducci R, Bianchi P, Guglielmi R, Mangiantini A, Sciarra F. Steroidal and non-steroidal factors in plasma sex hormone binding globulin regulation. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1992; 43(5):431-437.
120. Hammond GL, Lahteenmaki PL, Lahteenmaki P, Luukkainen T. Distribution and percentages of non-protein bound contraceptive steroids in human serum. **J Steroid Biochem** 1982; 17(4):375-380.
121. de Moor P, Joossens JV. An inverse relation between body weight and the activity of the steroid binding -globulin in human plasma. **Steroidologia** 1970; 1(3):129-136.
122. Glass AR, Swerdloff RS, Bray GA, Dahms WT, Atkinson RL. Low serum testosterone and sex-hormone-binding-globulin in massively obese men. **J Clin Endocrinol Metab** 1977; 45(6):1211-1219.

123. Kopelman PG, Pilkington TR, White N, Jeffcoate SL. Abnormal sex steroid secretion and binding in massively obese women. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1980; 12(4):363-369.
124. Pugeat M, Nader N, Hogeveen K, Raverot G, Dechaud H, Grenot C. Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: drugs and the metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol** 2010; 316(1):53-59.
125. Stone J, Folkard E, Doody D, et al. Familial correlations in postmenopausal serum concentrations of sex steroid hormones and other mitogens: a twins and sisters study. **J Clin Endocrinol Metab** 2009; 94(12):4793-4800.
126. Mousavinasab F, Tahtinen T, Jokelainen J, et al. The Pro12Ala polymorphism of the PPAR gamma 2 gene influences sex hormone-binding globulin level and its relationship to the development of the metabolic syndrome in young Finnish men. **Endocrine** 2006; 30(2):185-190.
127. Xita N, Tsatsoulis A. Genetic variants of sex hormone-binding globulin and their biological consequences. **Mol Cell Endocrinol** 2010; 316(1):60-65.
128. Pugeat M, Crave JC, Tourniaire J, Forest MG. Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement. **Horm Res** 1996; 45(3-5):148-155.
129. Barbe P, Bennet A, Stebenet M, Perret B, Louvet JP. 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(3):319-322.
130. Sarne DH, Refetoff S, Rosenfield RL, Farriaux JP. 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(4):740-746.
131. Peter A, Kantartzis K, Machann J, et al. Relationships of circulating sex hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. **Diabetes** 2010; 59(12):3167-3173.
132. Stefan N, Schick F, Haring HU. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes. **N Engl J Med** 2009; 361(27):2675-2676; author reply 2677-2678.
133. Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K, Mustajoki P, Kaukua J, Rissanen A. 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(3):208-215.
134. Sarwer DB, Spitzer JC, Wadden TA, et al. Sexual functioning and sex hormones in men who underwent bariatric surgery. **Surg Obes Relat Dis** 2014; 11(3):643-651.
135. Bhasin S, Jasjua GK, Pencina M, et al. Sex hormone-binding globulin, but not testosterone, is associated prospectively and independently with incident metabolic syndrome in men: the framingham heart study. **Diabetes Care** 2011; 34(11):2464-2470.
136. Fenske B, Kische H, Gross S, et al. Endogenous androgens and sex hormone-binding globulin in women and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab** 2015:jc20152546.
137. 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(5):1036-1041.
138. Li C, Ford ES, Li B, Giles WH, Liu S. Association of testosterone and sex hormone-binding globulin with metabolic syndrome and insulin resistance in men. **Diabetes Care** 2010; 33(7):1618-1624.
139. Rodriguez A, Muller DC, Metter EJ, et al. Aging, androgens, and the metabolic syndrome in a longitudinal study of aging. **J Clin Endocrinol Metab** 2007; 92(9):3568-3572.
140. Winters SJ, Gogineni J, Karegar M, et al. Sex hormone-binding globulin gene expression and insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab** 2014; 99(12):E2780-2788.
141. 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(12):1152-1163.

142. Perry JR, 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** 2010; 19(3):535-544.
143. Xia JW, Tan SJ, Zhang XL, Jun T, Sun XK, Ling W. Correlation of serum testosterone with insulin resistance in elderly male type 2 diabetes mellitus patients with osteoporosis. **J Diabetes Investig** 2015; 6(5):548-552.
144. Le TN, Nestler JE, Strauss JF, 3rd, Wickham EP, 3rd. Sex hormone-binding globulin and type 2 diabetes mellitus. **Trends Endocrinol Metab** 2012; 23(1):32-40.
145. Haffner SM, Katz MS, Stern MP, Dunn JF. Association of decreased sex hormone binding globulin and cardiovascular risk factors. **Arteriosclerosis** 1989; 9(1):136-143.
146. 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(10):1242-1249.
147. Kley HK, Edelmann P, Kruskemper HL. Relationship of plasma sex hormones to different parameters of obesity in male subjects. **Metabolism** 1980; 29(11):1041-1045.
148. Breckwoldt M, Zahradnik HP, Wieacker P. Hirsutism, its pathogenesis. **Hum Reprod** 1989; 4(6):601-604.
149. Brenta G, Schnitman M, Gurfinkiel M, et al. Variations of sex hormone-binding globulin in thyroid dysfunction. **Thyroid** 1999; 9(3):273-277.
150. Codaccioni JL, Orgiazzi J, Blanc P, Pugeat M, Roulier R, Carayon P. Lasting remissions in patients treated for Graves' hyperthyroidism with propranolol alone: a pattern of spontaneous evolution of the disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1988; 67(4):656-662.
151. Raggatt LE, Blok RB, Hamblin PS, Barlow JW. Effects of thyroid hormone on sex hormone-binding globulin gene expression in human cells. **J Clin Endocrinol Metab** 1992; 75(1):116-120.
152. Gawrieh S. Sex Hormones, Sex Hormone-Binding Globulin, and Liver Fat: Which Came First, the Chicken or the Egg? **Clin Gastroenterol Hepatol** 2015; 13(9):1694-1696.
153. Flechtner-Mors M, Schick A, Oeztuerk S, et al. Associations of fatty liver disease and other factors affecting serum SHBG concentrations: a population based study on 1657 subjects. **Horm Metab Res** 2014; 46(4):287-293.
154. 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(1):156-162.
155. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. **Lancet** 2007; 370(9588):685-697.
156. Power SG, Bocchinfuso WP, Pallesen M, Warmels-Rodenhiser S, Van Baelen H, Hammond GL. Molecular analyses of a human sex hormone-binding globulin variant: evidence for an additional carbohydrate chain. **J Clin Endocrinol Metab** 1992; 75(4):1066-1070.
157. Cui Y, Shu XO, Cai Q, et al. Association of breast cancer risk with a common functional polymorphism (Asp327Asn) in the sex hormone-binding globulin gene. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14(5):1096-1101.
158. Kataoka N, Cai Q, Xu WH, et al. Association of endometrial cancer risk with a functional polymorphism (Asp(327)Asn) in the sex hormone-binding globulin gene. **Cancer** 2007; 109(7):1296-1302.
159. Ohlsson C, Wallaschofski H, Lunetta KL, et al. Genetic determinants of serum testosterone concentrations in men. **PLoS Genet** 2011; 7(10):e1002313.
160. Riancho JA, Valero C, Zarrabeitia MT, Garcia-Unzueta MT, Amado JA, Gonzalez-Macias J. Genetic polymorphisms are associated with serum levels of sex hormone binding globulin in postmenopausal women. **BMC Med Genet** 2008; 9:112.

161. 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(12):3490-3498.
162. Dunning AM, Dowsett M, Healey CS, et al. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96(12):936-945.
163. Low YL, Taylor JI, Grace PB, et al. Polymorphisms in the CYP19 gene may affect the positive correlations between serum and urine phytoestrogen metabolites and plasma androgen concentrations in men. **J Nutr** 2005; 135(11):2680-2686.
164. Eriksson AL, Lorentzon M, Mellstrom D, et al. SHBG gene promoter polymorphisms in men are associated with serum sex hormone-binding globulin, androgen and androgen metabolite levels, and hip bone mineral density. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91(12):5029-5037.
165. White MJ, Eren F, Agirbasli D, Williams SM, Agirbasli M. SHBG gene polymorphism (rs1799941) associates with metabolic syndrome in children and adolescents. **PLoS One** 2015; 10(2):e0116915.
166. Haiman CA, Riley SE, Freedman ML, Setiawan VW, Conti DV, Le Marchand L. 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(4):2198-2204.
167. 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(2):917-924.
168. Turk A, Kopp P, Colangelo LA, et al. Associations of serum sex hormone binding globulin (SHBG) levels with SHBG gene polymorphisms in the CARDIA Male Hormone Study. **Am J Epidemiol** 2008; 167(4):412-418.
169. 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(2):303-310.
170. Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikyriakidou A, Georgiou I. Association of the (TAAAA)_n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88(12):5976-5980.
171. Ferik P, Teran N, Gersak K. The (TAAAA)_n microsatellite polymorphism in the SHBG gene influences serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod** 2007; 22(4):1031-1036.
172. Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE, Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. **Genes Dev** 1990; 4(12B):2353-2365.
173. Sladek FM. What are nuclear receptor ligands? **Mol Cell Endocrinol** 2011; 334(1-2):3-13.
174. Bolotin E, Liao H, Ta TC, et al. Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4alpha target genes using protein binding microarrays. **Hepatology** 2010; 51(2):642-653.
175. Xu Y, Zalzal M, Xu J, Li Y, Yin L, Zhang Y. A metabolic stress-inducible miR-34a-HNF4alpha pathway regulates lipid and lipoprotein metabolism. **Nat Commun** 2015; 6:7466.
176. Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma PH. Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89(14):6300-6303.
177. Lindstedt G, Lundberg PA, Lapidus L, Lundgren H, Bengtsson C, Bjorntorp P. Low sex-hormone-binding globulin concentration as independent risk factor for development of NIDDM. 12-yr follow-up of population study of women in Gothenburg, Sweden. **Diabetes** 1991; 40(1):123-128.
178. Farmer SR. Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. **Int J Obes (Lond)** 2005; 29 Suppl 1:S13-16.

179. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. **Science** 2003; 302(5644):453-457.
180. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes Dev** 2000; 14(11):1293-1307.
181. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, et al. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92(17):7921-7925.
182. Rautio K, Tapanainen JS, Ruokonen A, Morin-Papunen LC. Endocrine and metabolic effects of rosiglitazone in overweight women with PCOS: a randomized placebo-controlled study. **Hum Reprod** 2006; 21(6):1400-1407.
183. Sirito M, Lin Q, Deng JM, Behringer RR, Sawadogo M. Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95(7):3758-3763.
184. Sirito M, Lin Q, Maity T, Sawadogo M. Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. **Nucleic Acids Res** 1994; 22(3):427-433.
185. Kirschbaum BJ, Pognonec P, Roeder RG. Definition of the transcriptional activation domain of recombinant 43-kilodalton USF. **Mol Cell Biol** 1992; 12(11):5094-5101.
186. Corre S, Galibert MD. [USF as a key regulatory element of gene expression]. **Med Sci (Paris)** 2006; 22(1):62-67.
187. Gupta AK, Kone BC. USF-1 and USF-2 trans-repress IL-1beta-induced iNOS transcription in mesangial cells. **Am J Physiol Cell Physiol** 2002; 283(4):C1065-1072.
188. Leitman DC, Paruthiyil S, Vivar OI, et al. Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. **Curr Opin Pharmacol** 2010; 10(6):629-636.
189. Edmunds SE, Stubbs AP, Santos AA, Wilkinson ML. Estrogen and androgen regulation of sex hormone binding globulin secretion by a human liver cell line. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1990; 37(5):733-739.
190. Park JI, Tsai SY, Tsai MJ. Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. **Keio J Med** 2003; 52(3):174-181.
191. Plymate SR, Jones RE, Matej LA, Friedl KE. Regulation of sex hormone binding globulin (SHBG) production in Hep G2 cells by insulin. **Steroids** 1988; 52(4):339-340.
192. Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin. **J Clin Endocrinol Metab** 1988; 67(3):460-464.
193. Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM, Hammond GL. Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. **J Clin Invest** 2007; 117(12):3979-3987.
194. Simo R, Barbosa-Desongles A, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Potential role of tumor necrosis factor-alpha in downregulating sex hormone-binding globulin. **Diabetes** 2012; 61(2):372-382.
195. Crave JC, Lejeune H, Brebant C, Baret C, Pugeat M. Differential effects of insulin and insulin-like growth factor I on the production of plasma steroid-binding globulins by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. **J Clin Endocrinol Metab** 1995; 80(4):1283-1289.
196. Pasquali R, Macor C, Vicennati V, et al. Effects of acute hyperinsulinemia on testosterone serum concentrations in adult obese and normal-weight men. **Metabolism** 1997; 46(5):526-529.
197. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1991; 72(1):83-89.
198. Nogueira MA, Coelho AM, Sampietre SN, et al. Beneficial effects of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel opener on liver ischemia/reperfusion injury. **World J Gastroenterol** 2014; 20(41):15319-15326.
199. Xu B, Makris A, Thornton C, Ogle R, Horvath JS, Hennessy A. Antihypertensive drugs clonidine, diazoxide, hydralazine and furosemide regulate the production of cytokines by

- placentas and peripheral blood mononuclear cells in normal pregnancy. **J Hypertens** 2006; 24(5):915-922.
200. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol** 2010; 316(2):129-139.
201. Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, di Giovine FS, Duff GW. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. **Lancet** 1988; 2(8613):706-709.
202. Moelants EA, Mortier A, Van Damme J, Proost P. Regulation of TNF-alpha with a focus on rheumatoid arthritis. **Immunol Cell Biol** 2013; 91(6):393-401.
203. Guarda G, So A. Regulation of inflammasome activity. **Immunology** 2010; 130(3):329-336.
204. Mirone L, Altomonte L, D'Agostino P, Zoli A, Barini A, Magaro M. A study of serum androgen and cortisol levels in female patients with rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity. **Clin Rheumatol** 1996; 15(1):15-19.
205. Carlstrom K, Hedin PJ, Jonsson L, et al. Endocrine effects of the podophyllotoxine derivative drug CPH 82 (Reumacon) in patients with rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol** 2000; 29(2):89-94.
206. Sattar N, Crompton P, Cherry L, Kane D, Lowe G, McInnes IB. Effects of tumor necrosis factor blockade on cardiovascular risk factors in psoriatic arthritis: a double-blind, placebo-controlled study. **Arthritis Rheum** 2007; 56(3):831-839.
207. Simo R, Barbosa-Desongles A, Saez-Lopez C, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Molecular Mechanism of TNFalpha-Induced Down-Regulation of SHBG Expression. **Mol Endocrinol** 2012; 26(3):438-446.
208. Simo R, Barbosa-Desongles A, Hernandez C, Selva DM. IL1beta down-regulation of sex hormone-binding globulin production by decreasing HNF-4alpha via MEK-1/2 and JNK MAPK pathways. **Mol Endocrinol** 2012; 26(11):1917-1927.
209. Mathieu P, Lemieux I, Despres JP. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. **Clin Pharmacol Ther** 2010; 87(4):407-416.
210. Morisset AS, Blouin K, Tchernof A. Impact of diet and adiposity on circulating levels of sex hormone-binding globulin and androgens. **Nutr Rev** 2008; 66(9):506-516.
211. 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(1):25-33.
212. Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Stanczyk FZ, Pike MC. Dietary patterns and breast cancer risk in Asian American women. **Am J Clin Nutr** 2009; 89(4):1145-1154.
213. Goldin BR, Woods MN, Spiegelman DL, et al. The effect of dietary fat and fiber on serum estrogen concentrations in premenopausal women under controlled dietary conditions. **Cancer** 1994; 74(3 Suppl):1125-1131.
214. Key TJ, Roe L, Thorogood M, Moore JW, Clark GM, Wang DY. Testosterone, sex hormone-binding globulin, calculated free testosterone, and oestradiol in male vegans and omnivores. **Br J Nutr** 1990; 64(1):111-119.
215. Armstrong BK, Brown JB, Clarke HT, et al. Diet and reproductive hormones: a study of vegetarian and nonvegetarian postmenopausal women. **J Natl Cancer Inst** 1981; 67(4):761-767.
216. Belanger A, Locong A, Noel C, et al. Influence of diet on plasma steroids and sex hormone-binding globulin levels in adult men. **J Steroid Biochem** 1989; 32(6):829-833.
217. Vermeulen A, Kaufman JM, Giagulli VA. Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81(5):1821-1826.
218. Longcope C, Feldman HA, McKinlay JB, Araujo AB. Diet and sex hormone-binding globulin. **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85(1):293-296.

219. Longcope C, Yosha S, Young RA, Baker S, Braverman LE. The effects of low-protein diet and testosterone on sex hormone-binding globulin capacity in male rabbits. **Metabolism** 1987; 36(7):703-707.
220. Jacques H, Noreau L, Moorjani S. Effects on plasma lipoproteins and endogenous sex hormones of substituting lean white fish for other animal-protein sources in diets of postmenopausal women. **Am J Clin Nutr** 1992; 55(4):896-901.
221. Reed MJ, Cheng RW, Simmonds M, Richmond W, James VH. Dietary lipids: an additional regulator of plasma levels of sex hormone binding globulin. **J Clin Endocrinol Metab** 1987; 64(5):1083-1085.
222. Blouin K, Robitaille J, Belanger 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(1):22-33.
223. Kotsopoulos J, Eliassen AH, Missmer SA, Hankinson SE, Tworoger SS. Relationship between caffeine intake and plasma sex hormone concentrations in premenopausal and postmenopausal women. **Cancer** 2009; 115(12):2765-2774.
224. Goto A, Song Y, Chen BH, Manson JE, Buring JE, Liu S. Coffee and caffeine consumption in relation to sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in postmenopausal women. **Diabetes** 2011; 60(1):269-275.
225. Archer DF, Thomas MA, Conard J, et al. Impact on Hepatic Estrogen-Sensitive Proteins by a One-Year Contraceptive Vaginal Ring Delivering Nestorone(R) and Ethinyl Estradiol. **Contraception** 2015.
226. Pugeat M, Lejeune H, Mazenod B, Dechaud H, Fleury MC, Tourniaire J. Changes in plasma binding protein of sex steroids and transcortin during the treatment of menopause with oral estrogens. **Presse Med** 1988; 17(23):1189-1192.
227. van Kammen E, Thijssen JH, Rademaker B, Schwarz F. The influence of hormonal contraceptives on sex hormone binding globulin (SHBG) capacity. **Contraception** 1975; 11(1):53-59.
228. Odland V, Elamsson K, Englund DE, Victor A, Johansson ED. Effects of oestradiol on sex hormone binding globulin. **Acta Endocrinol (Copenh)** 1982; 101(2):248-253.
229. Loukovaara M, Carson M, Adlercreutz H. Regulation of sex-hormone-binding globulin production by endogenous estrogens in vitro. **Biochem Biophys Res Commun** 1995; 206(3):895-901.
230. Rosner W, Aden DP, Khan MS. Hormonal influences on the secretion of steroid-binding proteins by a human hepatoma-derived cell line. **J Clin Endocrinol Metab** 1984; 59(4):806-808.
231. Selva DM, Hammond GL. Thyroid hormones act indirectly to increase sex hormone-binding globulin production by liver via hepatocyte nuclear factor-4alpha. **J Mol Endocrinol** 2009; 43(1):19-27.
232. Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, Martinez JA. Genes, lifestyles and obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord** 2004; 28 Suppl 3:S29-36.
233. Zamanian-Azodi M, Vafaei R, Azodi T, et al. Molecular approaches in obesity studies. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench** 2013; 6(Suppl 1):S23-31.
234. James PT. Obesity: the worldwide epidemic. **Clin Dermatol** 2004; 22(4):276-280.
235. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **Int J Obes (Lond)** 2008; 32(9):1431-1437.
236. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet** 2014; 384(9945):766-781.
237. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. **Int J Obes (Lond)** 2008; 32 Suppl 7:S109-119.
238. Albarrán J. Endocrinología. **Editorial Médica Panamericana** 2010.

239. Bjorntorp P, Ostman J. Human adipose tissue dynamics and regulation. **Adv Metab Disord** 1971; 5:277-327.
240. Hirsch J, Knittle JL. Cellularity of obese and nonobese human adipose tissue. **Fed Proc** 1970; 29(4):1516-1521.
241. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89(6):2548-2556.
242. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int J Obes Relat Metab Disord** 1998; 22(12):1145-1158.
243. Rodriguez A, Ezquerro S, Mendez-Gimenez L, Becerril S, Fruhbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2015; 309(8):E691-714.
244. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr Rev** 2000; 21(6):697-738.
245. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol** 2011; 11(2):85-97.
246. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest** 2003; 112(12):1796-1808.
247. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **J Clin Invest** 2003; 112(12):1785-1788.
248. Canello R, Henegar C, Viguerie N, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes** 2005; 54(8):2277-2286.
249. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. **Int J Obes Relat Metab Disord** 2002; 26(11):1407-1433.
250. Anubhuti, Arora S. Leptin and its metabolic interactions: an update. **Diabetes Obes Metab** 2008; 10(11):973-993.
251. Ahima RS. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. **J Clin Invest** 2008; 118(7):2380-2383.
252. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature** 1994; 372(6505):425-432.
253. Esser N, L'Homme L, De Roover A, et al. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. **Diabetologia** 2013; 56(11):2487-2497.
254. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nat Med** 2011; 17(2):179-188.
255. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **Diabetes** 2003; 52(3):812-817.
256. McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, et al. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. **Diabetes** 2011; 60(6):1688-1698.
257. Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. **J Cell Sci** 2002; 115(Pt 4):679-688.
258. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. **Sci Signal** 2010; 3(105):cm2.
259. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science** 1993; 259(5091):87-91.
260. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature** 1997; 389(6651):610-614.

261. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **J Clin Invest** 1995; 95(5):2111-2119.
262. Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. **Am J Physiol** 1998; 275(3 Pt 1):G387-392.
263. Israel A. Signal transduction. IkkappaB kinase all zipped up. **Nature** 1997; 388(6642):519-521.
264. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem** 1995; 270(45):26746-26749.
265. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J Biol Chem** 1996; 271(18):10697-10703.
266. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). **Biochem Biophys Res Commun** 1996; 221(2):286-289.
267. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. **J Biochem** 1996; 120(4):803-812.
268. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 257(1):79-83.
269. Tsao TS, Lodish HF, Fruebis J. ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. **Eur J Pharmacol** 2002; 440(2-3):213-221.
270. Viengchareun S, Zennaro MC, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. **FEBS Lett** 2002; 532(3):345-350.
271. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? **Diabetes Care** 2003; 26(8):2442-2450.
272. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. **Diabetes** 2001; 50(9):2094-2099.
273. Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. **Hormones (Athens)** 2012; 11(1):8-20.
274. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature** 2003; 423(6941):762-769.
275. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med** 2002; 8(11):1288-1295.
276. Koo SH, Flechner L, Qi L, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. **Nature** 2005; 437(7062):1109-1111.
277. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. **J Clin Invest** 2003; 112(1):91-100.
278. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. **Acta Physiol (Oxf)** 2009; 196(1):81-98.
279. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **Eur J Endocrinol** 2003; 148(3):293-300.
280. Lee HP, Lin CY, Shih JS, et al. Adiponectin promotes VEGF-A-dependent angiogenesis in human chondrosarcoma through PI3K, Akt, mTOR, and HIF-alpha pathway. **Oncotarget** 2015.
281. Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. **Hypertension** 2006; 47(6):1108-1116.
282. Pajvani UB, Du X, Combs TP, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. **J Biol Chem** 2003; 278(11):9073-9085.

283. Xu A, Wang H, Hoo RL, et al. Selective elevation of adiponectin production by the natural compounds derived from a medicinal herb alleviates insulin resistance and glucose intolerance in obese mice. **Endocrinology** 2009; 150(2):625-633.
284. Hotta K, Matsuzawa Y. [Molecular mechanism in the development of the complications associated with obesity--the physiological and pathological role of adipocytokines]. **Nihon Rinsho** 2001; 59(3):481-486.
285. Wanderley Rocha DR, Jorge AR, Braulio VB, Arbex AK, Marcadenti A. Visceral adiposity measurements, metabolic and inflammatory profile in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional analysis. **Curr Diabetes Rev** 2015.
286. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2000; 20(6):1595-1599.
287. Adamczak M, Rzepka E, Chudek J, Wiecek A. Ageing and plasma adiponectin concentration in apparently healthy males and females. **Clin Endocrinol (Oxf)** 2005; 62(1):114-118.
288. Combs TP, Wagner JA, Berger J, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. **Endocrinology** 2002; 143(3):998-1007.
289. Haluzik M, Parizkova J, Haluzik MM. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. **Physiol Res** 2004; 53(2):123-129.
290. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest** 2006; 116(7):1784-1792.
291. Aleidi S, Issa A, Bustanji H, Khalil M, Bustanji Y. Adiponectin serum levels correlate with insulin resistance in type 2 diabetic patients. **Saudi Pharm J** 2015; 23(3):250-256.
292. Aprahamian TR, Sam F. Adiponectin in cardiovascular inflammation and obesity. **Int J Inflamm** 2011; 2011:376909.
293. Niafar M, Nader ND. Adiponectin as serum biomarker of insulin resistance in patients with polycystic ovarian syndrome. **Gynecol Endocrinol** 2015; 31(6):473-476.
294. de Oliveira C, Iwanaga-Carvalho C, Mota JF, Oyama LM, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Effects of adrenal hormones on the expression of adiponectin and adiponectin receptors in adipose tissue, muscle and liver. **Steroids** 2011; 76(12):1260-1267.
295. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 290(3):1084-1089.
296. Mandard S KS. Regulation of lipogenic genes in obesity. **Nutritional Genomics : Impact on Health and Disease, Wiley-VCH** 2011:208-219.
297. Szkudelski T, Nogowski L, Szkudelska K. Short-term regulation of adiponectin secretion in rat adipocytes. **Physiol Res** 2011; 60(3):521-530.
298. Phillips SA, Kung JT. Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target. **Curr Opin Pharmacol** 2010; 10(6):676-683.
299. Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Murohara T, Ouchi N. Adiponectin as a Target in Obesity-related Inflammatory State. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets** 2015; 15(2):145-150.
300. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nat Med** 2001; 7(8):947-953.
301. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98(4):2005-2010.
302. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. **Circulation** 2002; 105(24):2893-2898.

303. Ghantous CM, Azrak Z, Hanache S, Abou-Kheir W, Zeidan A. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. **Int J Endocrinol** 2015; 2015:534320.
304. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation** 2002; 106(22):2767-2770.
305. Xita N, Tsatsoulis A. Adiponectin in diabetes mellitus. **Curr Med Chem** 2012; 19(32):5451-5458.
306. Esfahani M, Movahedian A, Baranchi M, Goodarzi MT. Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. **Iran J Basic Med Sci** 2015; 18(5):430-442.
307. Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. **J Gastroenterol Hepatol** 2007; 22 Suppl 1:S87-92.
308. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. **Gastroenterology** 2003; 125(6):1796-1807.
309. Wang Y, Zhou M, Lam KS, Xu A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2009; 53(2):201-212.
310. Wang Q, Jiang L, Wang J, et al. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. **Hepatology** 2009; 49(4):1166-1175.
311. Bonnet F, Balkau B, Malecot JM, et al. Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. **Eur J Endocrinol** 2009; 161(1):81-85.
312. Gannage-Yared MH, Khalife S, Semaan M, Fares F, Jambart S, Halaby G. 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(1):167-176.
313. Sieminska L, Foltyn W, Glogowska-Szelag J, et al. Relationships between adiponectin, sex hormone binding globulin and insulin resistance in hyperthyroid Graves' disease women. **Endokrynol Pol** 2013; 64(1):26-29.
314. 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(1-2):69-75.
315. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999. **Biochem Biophys Res Commun** 2012; 425(3):560-564.
316. Oh KW, Lee WY, Rhee EJ, et al. The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men. **Clin Endocrinol (Oxf)** 2005; 63(2):131-138.
317. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. 2015.
318. Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. **Lancet** 2010; 375(9710):181-183.
319. Mayi TH, Daoudi M, Derudas B, et al. Human adipose tissue macrophages display activation of cancer-related pathways. **J Biol Chem** 2012; 287(26):21904-21913.
320. Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, Eckel J. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2012; 302(11):H2148-2165.
321. Valle E, Storace D, Sanguineti R, et al. Association of the glycoxidative stress marker pentosidine with equine laminitis. **Vet J** 2013; 196(3):445-450.
322. Freemantle N, Holmes J, Hockey A, Kumar S. How strong is the association between abdominal obesity and the incidence of type 2 diabetes? **Int J Clin Pract** 2008; 62(9):1391-1396.
323. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature** 2006; 444(7121):840-846.
324. Astrup A, Finer N. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? **Obes Rev** 2000; 1(2):57-59.
325. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care** 1998; 21(9):1414-1431.

326. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine a. Obesity and reproduction: an educational bulletin. **Fertil Steril** 2008; 90(3):21-27.
327. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. **Fertil Steril** 2008; 90(4):897-904.
328. Kley HK, Deselaers T, Peerenboom H, Kruskemper HL. Enhanced conversion of androstenedione to estrogens in obese males. **J Clin Endocrinol Metab** 1980; 51(5):1128-1132.
329. Jarow JP, Kirkland J, Koritnik DR, Cefalu WT. Effect of obesity and fertility status on sex steroid levels in men. **Urology** 1993; 42(2):171-174.
330. Bray GA. Obesity and reproduction. **Hum Reprod** 1997; 12 Suppl 1:26-32.
331. Fedorcsak P, Dale PO, Storeng R, et al. Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. **Hum Reprod** 2004; 19(11):2523-2528.
332. Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA, Botto LD, Moore CA. Maternal obesity and risk for birth defects. **Pediatrics** 2003; 111(5 Pt 2):1152-1158.
333. Sam S. Obesity and Polycystic Ovary Syndrome. **Obes Manag** 2007; 3(2):69-73.
334. Hausberger FX, Hausberger BC. Castration-induced obesity in mice. Body composition, histology of adrenal cortex and islets of Langerhans in castrated mice. **Acta Endocrinol (Copenh)** 1966; 53(4):571-583.
335. Wade GN, Schneider JE. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. **Neurosci Biobehav Rev** 1992; 16(2):235-272.
336. Bray GA, York DA, Fisler JS. Experimental obesity: a homeostatic failure due to defective nutrient stimulation of the sympathetic nervous system. **Vitam Horm** 1989; 45:1-125.
337. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabet Med** 2005; 22(9):1129-1133.
338. Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Epidemiol** 2007; 17(11):863-869.
339. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **Int J Exp Pathol** 2006; 87(1):1-16.
340. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol Hepatol** 2002; 17 Suppl:S186-190.
341. Skelly MM, James PD, Ryder SD. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. **J Hepatol** 2001; 35(2):195-199.
342. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology** 2004; 40(6):1387-1395.
343. Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Am J Epidemiol** 2013; 178(1):38-45.
344. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **J Hepatol** 2013; 58(3):593-608.
345. Clark JM, Diehl AM. Defining nonalcoholic fatty liver disease: implications for epidemiologic studies. **Gastroenterology** 2003; 124(1):248-250.
346. Shen L, Fan JG, Shao Y, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey. **World J Gastroenterol** 2003; 9(5):1106-1110.
347. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. **Ann Intern Med** 2000; 132(2):112-117.
348. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Risk factors for alcoholic liver disease. **Addict Biol** 2000; 5(3):261-268.
349. Del Gaudio A, Boschi L, Del Gaudio GA, Mastrangelo L, Munari D. Liver damage in obese patients. **Obes Surg** 2002; 12(6):802-804.
350. Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. **J Gastroenterol Hepatol** 2004; 19(8):854-858.
351. Williams KH, Shackel NA, Gorrell MD, McLennan SV, Twigg SM. Diabetes and nonalcoholic Fatty liver disease: a pathogenic duo. **Endocr Rev** 2013; 34(1):84-129.

352. Kim HJ, Kim HJ, Lee KE, et al. Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults. **Arch Intern Med** 2004; 164(19):2169-2175.
353. Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. **Cleve Clin J Med** 2008; 75(10):721-728.
354. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes** 2001; 50(8):1844-1850.
355. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. **Dig Liver Dis** 2015; 47(3):181-190.
356. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Jarvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? **Dig Liver Dis** 2010; 42(5):320-330.
357. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol** 2013; 48(4):434-441.
358. Jensen-Urstad AP, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? **Biochim Biophys Acta** 2012; 1821(5):747-753.
359. Sanders FW, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biol Rev Camb Philos Soc** 2015.
360. Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. **J Clin Endocrinol Metab** 2011; 96(5):1424-1430.
361. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. **Hepatology** 2004; 40(1):185-194.
362. Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. **J Biol Chem** 1996; 271(22):13018-13022.
363. Sanal MG. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease-the emperor has no clothes? **World J Gastroenterol** 2015; 21(11):3223-3231.
364. Chu CJ, Lu RH, Wang SS, et al. Risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese patients and the role of tumor necrosis factor-alpha. **Hepatogastroenterology** 2007; 54(79):2099-2102.
365. Das SK, Balakrishnan V. Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. **Indian J Clin Biochem** 2011; 26(2):202-209.
366. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. Animal models of obesity. **Obes Rev** 2007; 8 Suppl 1:55-61.
367. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. **Curr Diabetes Rev** 2014; 10(2):131-145.
368. 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(3):491-495.
369. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science** 1995; 269(5223):546-549.
370. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science** 1995; 269(5223):543-546.
371. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia** 1978; 14(3):141-148.
372. Katsuda Y OT, Shinohara M, Bin Tong, Yamada Takahisa. Diabetic mouse models. **Open Journal of Animal Sciences** 2013; 3(4):334-342.
373. Like AA, Lavine RL, Poffenbarger PL, Chick WL. Studies in the diabetic mutant mouse. VI. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. **Am J Pathol** 1972; 66(2):193-224.
374. Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. **Genomics** 1991; 11(4):1054-1062.

375. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. **J Hered** 1950; 41(12):317-318.
376. Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR. Fatty acid synthesis in obese insulin resistant diabetic mice. **Horm Metab Res** 1994; 26(2):85-87.
377. Begin-Heick N. Beta-adrenergic receptors and G-proteins in the ob/ob mouse. **Int J Obes Relat Metab Disord** 1996; 20 Suppl 3:S32-35.
378. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/.
379. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. **Lancet** 1997; 349(9063):1436-1442.
380. Chambless L, Keil U, Dobson A, et al. Population versus clinical view of case fatality from acute coronary heart disease: results from the WHO MONICA Project 1985-1990. Multinational MONitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease. **Circulation** 1997; 96(11):3849-3859.
381. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. **Lancet** 1999; 353(9164):1547-1557.
382. Dawber TR, Kannel WB. An epidemiologic study of heart disease: the Framingham study. **Nutr Rev** 1958; 16(1):1-4.
383. <http://www.world-heart-federation.org/press/fact-sheets/cardiovascular-disease-risk-factors/>.
384. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. **Circulation** 1983; 67(5):968-977.
385. Neaton JD, Blackburn H, Jacobs D, et al. Serum cholesterol level and mortality findings for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. **Arch Intern Med** 1992; 152(7):1490-1500.
386. Eckel RH. Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. **Circulation** 1997; 96(9):3248-3250.
387. Poirier P, Giles TD, Bray GA, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. **Circulation** 2006; 113(6):898-918.
388. Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2008; 28(6):1039-1049.
389. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature** 2006; 444(7121):875-880.
390. Gordon T, Kannel WB. Obesity and cardiovascular diseases: the Framingham study. **Clin Endocrinol Metab** 1976; 5(2):367-375.
391. Felix-Redondo FJ, Grau M, Baena-Diez JM, et al. Prevalence of obesity and associated cardiovascular risk: the DARIOS study. **BMC Public Health** 2013; 13:542.
392. Canoy D, Boekholdt SM, Wareham N, et al. Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-based prospective study. **Circulation** 2007; 116(25):2933-2943.
393. Keys A. Coronary heart disease in seven countries. 1970. **Nutrition** 1997; 13(3):250-252; discussion 249, 253.
394. Keys A, Aravanis C, Blackburn HW, et al. Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. **Acta Med Scand Suppl** 1966; 460:1-392.

395. Menotti A, Keys A, Aravanis C, et al. Seven Countries Study. First 20-year mortality data in 12 cohorts of six countries. **Ann Med** 1989; 21(3):175-179.
396. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. **Am J Epidemiol** 1986; 124(6):903-915.
397. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. **N Engl J Med** 2013; 368(14):1279-1290.
398. Knuops KT, de Groot LC, Kromhout D, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. **Jama** 2004; 292(12):1433-1439.
399. Menotti A, Keys A, Kromhout D, et al. Twenty-five-year mortality from coronary heart disease and its prediction in five cohorts of middle-aged men in Finland, The Netherlands, and Italy. **Prev Med** 1990; 19(3):270-278.
400. 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(2):141-147.
401. Tektonidis TG, Akesson A, Gigante B, Wolk A, Larsson SC. A Mediterranean diet and risk of myocardial infarction, heart failure and stroke: A population-based cohort study. **Atherosclerosis** 2015; 243(1):93-98.
402. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. **N Engl J Med** 2003; 348(26):2599-2608.
403. Tunstall-Pedoe H, Woodward M, Tavendale R, A'Brook R, McCluskey MK. Comparison of the prediction by 27 different factors of coronary heart disease and death in men and women of the Scottish Heart Health Study: cohort study. **Bmj** 1997; 315(7110):722-729.
404. van den Brandt PA. The impact of a Mediterranean diet and healthy lifestyle on premature mortality in men and women. **Am J Clin Nutr** 2011; 94(3):913-920.
405. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. **Circulation** 1999; 99(6):779-785.
406. Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Estruch R, et al. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. **Adv Nutr** 2014; 5(3):330S-336S.
407. Helsing E. Nutrition policies in Europe--the state of the art. **Eur J Clin Nutr** 1989; 43 Suppl 2:57-66.
408. Nestle M. Mediterranean diets: historical and research overview. **Am J Clin Nutr** 1995; 61(6 Suppl):1313S-1320S.
409. Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. **Am J Clin Nutr** 1995; 61(6 Suppl):1402S-1406S.
410. Wahrburg U, Assmann G. Properties of olive oil. **Lancet** 2001; 357(9268):1626.
411. Fernandez-Jarne E, Martinez-Losa E, Prado-Santamaria M, Brugarolas-Brufau C, Serrano-Martinez M, Martinez-Gonzalez MA. Risk of first non-fatal myocardial infarction negatively associated with olive oil consumption: a case-control study in Spain. **Int J Epidemiol** 2002; 31(2):474-480.
412. Violi F, Loffredo L, Pignatelli P, et al. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. **Nutr Diabetes** 2015; 5:e172.
413. Visioli F, Galli C. Antiatherogenic components of olive oil. **Curr Atheroscler Rep** 2001; 3(1):64-67.
414. Alimentarius CotC. Report of the fifteenth session of the codex committee on fats and oils. **FAO** 1996.
415. Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, Connor WE. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. **Circulation** 1993; 88(6):2771-2779.

416. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. **N Engl J Med** 1997; 337(21):1491-1499.
417. Perdomo L, Beneit N, Otero YF, et al. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. **Cardiovasc Diabetol** 2015; 14:75.
418. Pietinen P, Ascherio A, Korhonen P, et al. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. **Am J Epidemiol** 1997; 145(10):876-887.
419. Benito P, Caballero J, Moreno J, et al. Effects of milk enriched with omega-3 fatty acid, oleic acid and folic acid in patients with metabolic syndrome. **Clin Nutr** 2006; 25(4):581-587.
420. Carrillo C, Cavia Mdel M, Alonso-Torre SR. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review. **Nutr Hosp** 2012; 27(6):1860-1865.
421. Mata P, de Oya M. [Diet and cardiovascular disease]. **Rev Clin Esp** 1993; 192(1):41-48.
422. Ryan M, McInerney D, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. **Qjm** 2000; 93(2):85-91.
423. Soriguer F, Esteve I, Rojo-Martinez G, et al. Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). **Eur J Endocrinol** 2004; 150(1):33-39.
424. Teres S, Barcelo-Coblijn G, Benet M, et al. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105(37):13811-13816.
425. Brand JS, van der Tweel I, Grobbee DE, Emmelot-Vonk MH, van der Schouw YT. Testosterone, sex hormone-binding globulin and the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Int J Epidemiol** 2011; 40(1):189-207.
426. Kalyani RR, Franco M, Dobs AS, et al. The association of endogenous sex hormones, adiposity, and insulin resistance with incident diabetes in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab** 2009; 94(11):4127-4135.
427. Karim R, Hodis HN, Stanczyk FZ, Lobo RA, Mack WJ. Relationship between serum levels of sex hormones and progression of subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab** 2008; 93(1):131-138.
428. French FS, Ritzen EM. Androgen-binding protein in efferent duct fluid of rat testis. **J Reprod Fertil** 1973; 32(3):479-483.
429. Koranyi L, James D, Mueckler M, Permutt MA. Glucose transporter levels in spontaneously obese (db/db) insulin-resistant mice. **J Clin Invest** 1990; 85(3):962-967.
430. Goldstein DJ. Beneficial health effects of modest weight loss. **Int J Obes Relat Metab Disord** 1992; 16(6):397-415.
431. Boquist L, Hellman B, Lernmark A, Taljedal IB. Influence of the mutation "diabetes" on insulin release and islet morphology in mice of different genetic backgrounds. **J Cell Biol** 1974; 62(1):77-89.
432. Abu-Elheiga L, Wu H, Gu Z, Bressler R, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2-/- mutant mice are protected against fatty liver under high-fat, high-carbohydrate dietary and de novo lipogenic conditions. **J Biol Chem** 2012; 287(15):12578-12588.
433. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. **Cmaj** 2005; 172(7):899-905.
434. Garmes HM, Tambascia MA, Zantut-Wittmann DE. Endocrine-metabolic effects of the treatment with pioglitazone in obese patients with polycystic ovary syndrome. **Gynecol Endocrinol** 2005; 21(6):317-323.
435. Sepilian V, Nagamani M. Effects of rosiglitazone in obese women with polycystic ovary syndrome and severe insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90(1):60-65.
436. Tarkun I, Cetinarslan B, Turemen E, Sahin T, Canturk Z, Komsuoglu B. Effect of rosiglitazone on insulin resistance, C-reactive protein and endothelial function in non-obese young women with polycystic ovary syndrome. **Eur J Endocrinol** 2005; 153(1):115-121.

437. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nat Genet** 1998; 20(3):284-287.
438. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, et al. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. **Endocrinology** 2000; 141(11):4021-4031.
439. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. **Hum Reprod Update** 2010; 16(3):293-311.
440. 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(6):877-883.
441. Li Y, Liu L, Wang B, Chen D, Wang J. Nonalcoholic fatty liver disease and alteration in semen quality and reproductive hormones. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2015; 27(9):1069-1073.
442. 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(9):1686-1693 e1682.
443. Trak-Smayra V, Paradis V, Massart J, Nasser S, Jebara V, Fromenty B. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. **Int J Exp Pathol** 2011; 92(6):413-421.
444. Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. **Endocr J** 2008; 55(4):617-624.
445. Bray GA, Popkin BM. Calorie-sweetened beverages and fructose: what have we learned 10 years later. **Pediatr Obes** 2013; 8(4):242-248.
446. Jin R, Vos MB. Fructose and liver function--is this behind nonalcoholic liver disease? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 2015; 18(5):490-495.
447. Moore JB, Gunn PJ, Fielding BA. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients** 2014; 6(12):5679-5703.
448. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiol Rev** 2010; 90(1):23-46.
449. Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Park S, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. **Diabetes** 2005; 54(7):1907-1913.
450. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol** 2008; 48(6):993-999.
451. Assy N, Nasser G, Kamayse I, et al. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. **Can J Gastroenterol** 2008; 22(10):811-816.
452. Chan SM, Sun RQ, Zeng XY, et al. Activation of PPARalpha ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. **Diabetes** 2013; 62(6):2095-2105.
453. de Castro UG, dos Santos RA, Silva ME, de Lima WG, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids Health Dis** 2013; 12:136.
454. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2002; 282(5):E1180-1190.
455. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World J Gastroenterol** 2012; 18(19):2300-2308.

456. Haider A, Gooren LJ, Padungtod P, Saad F. Improvement of the metabolic syndrome and of non-alcoholic liver steatosis upon treatment of hypogonadal elderly men with parenteral testosterone undecanoate. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 2010; 118(3):167-171.
457. Huang G, Bhasin S, Tang ER, et al. Effect of testosterone administration on liver fat in older men with mobility limitation: results from a randomized controlled trial. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 2013; 68(8):954-959.
458. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **J Clin Invest** 2008; 118(3):829-838.
459. Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 2010; 45(3):199-214.
460. Wakil SJ, Stoops JK, Joshi VC. Fatty acid synthesis and its regulation. **Annu Rev Biochem** 1983; 52:537-579.
461. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. **Science** 2001; 291(5513):2613-2616.
462. Beigneux AP, Kosinski C, Gavino B, Horton JD, Skarnes WC, Young SG. ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. **J Biol Chem** 2004; 279(10):9557-9564.
463. Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, et al. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104(42):16480-16485.
464. Harada N, Oda Z, Hara Y, et al. Hepatic de novo lipogenesis is present in liver-specific ACC1-deficient mice. **Mol Cell Biol** 2007; 27(5):1881-1888.
465. Oh W, Abu-Elheiga L, Kordari P, et al. Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102(5):1384-1389.
466. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest** 2004; 114(2):147-152.
467. Pettinelli P, Obregon AM, Videla LA. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Nutr Hosp** 2011; 26(3):441-450.
468. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. **J Biol Chem** 2003; 278(36):34268-34276.
469. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, et al. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. **J Clin Invest** 2003; 111(5):737-747.
470. Moran-Salvador E, Lopez-Parra M, Garcia-Alonso V, et al. Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. **Faseb J** 2011; 25(8):2538-2550.
471. Viollet B, Foretz M, Guigas B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. **J Physiol** 2006; 574(Pt 1):41-53.
472. Saha AK, Persons K, Safer JD, Luo Z, Holick MF, Ruderman NB. AMPK regulation of the growth of cultured human keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 2006; 349(2):519-524.
473. Liu X, Chhipa RR, Nakano I, Dasgupta B. The AMPK inhibitor compound C is a potent AMPK-independent antiangioma agent. **Mol Cancer Ther** 2014; 13(3):596-605.
474. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. **World J Gastroenterol** 2011; 17(23):2801-2811.
475. Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. **Gut** 2005; 54(1):117-121.
476. Turer AT, Khera A, Ayers CR, et al. Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. **Diabetologia** 2011; 54(10):2515-2524.

477. Wree A, Schlattjan M, Bechmann LP, et al. Adipocyte cell size, free fatty acids and apolipoproteins are associated with non-alcoholic liver injury progression in severely obese patients. **Metabolism** 2014; 63(12):1542-1552.
478. Asano T, Watanabe K, Kubota N, et al. Adiponectin knockout mice on high fat diet develop fibrosing steatohepatitis. **J Gastroenterol Hepatol** 2009; 24(10):1669-1676.
479. Liu Q, Yuan B, Lo KA, Patterson HC, Sun Y, Lodish HF. Adiponectin regulates expression of hepatic genes critical for glucose and lipid metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2012; 109(36):14568-14573.
480. Neumeier M, Sigrüener A, Eggenhofer E, et al. High molecular weight adiponectin reduces apolipoprotein B and E release in human hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 352(2):543-548.
481. Wong GW, Krawczyk SA, Kitidis-Mitrokostas C, Revett T, Gimeno R, Lodish HF. Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions. **Biochem J** 2008; 416(2):161-177.
482. Peterson JM, Seldin MM, Wei Z, Aja S, Wong GW. CTRP3 attenuates diet-induced hepatic steatosis by regulating triglyceride metabolism. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2013; 305(3):G214-224.
483. Peterson JM, Wei Z, Wong GW. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3), a novel adipokine that regulates hepatic glucose output. **J Biol Chem** 2010; 285(51):39691-39701.
484. Wolf RM, Steele KE, Peterson LA, Magnuson TH, Schweitzer MA, Wong GW. Lower Circulating C1q/TNF-Related Protein-3 (CTRP3) Levels Are Associated with Obesity: A Cross-Sectional Study. **PLoS One** 2015; 10(7):e0133955.
485. Li X, Jiang L, Yang M, Wu YW, Sun SX, Sun JZ. CTRP3 modulates the expression and secretion of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. **Endocr J** 2014; 61(12):1153-1162.
486. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2001; 280(5):E745-751.
487. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. **Diabetes** 2002; 51(9):2734-2741.
488. Eglit T, Lember M, Ringmets I, Rajasalu T. Gender differences in serum high-molecular-weight adiponectin levels in metabolic syndrome. **Eur J Endocrinol** 2013; 168(3):385-391.
489. Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ros E, et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 2010; 20(4):284-294.
490. Field AE, Colditz GA, Willett WC, Longcope C, McKinlay JB. The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 79(5):1310-1316.
491. Tymchuk CN, Tessler SB, Barnard RJ. Changes in sex hormone-binding globulin, insulin, and serum lipids in postmenopausal women on a low-fat, high-fiber diet combined with exercise. **Nutr Cancer** 2000; 38(2):158-162.
492. Kaaks R, Bellati C, Venturelli E, et al. Effects of dietary intervention on IGF-I and IGF-binding proteins, and related alterations in sex steroid metabolism: the Diet and Androgens (DIANA) Randomised Trial. **Eur J Clin Nutr** 2003; 57(9):1079-1088.
493. FDA. <http://www.fda.gov/dms/qhchoice/html>. 2004:4-100.
494. Soriguer F, Rojo-Martinez G, Almaraz MC, et al. Incidence of type 2 diabetes in southern Spain (Pizarra Study). **Eur J Clin Invest** 2008; 38(2):126-133.
495. Soriguer F, Rubio-Martin E, Fernandez D, et al. Testosterone, SHBG and risk of type 2 diabetes in the second evaluation of the Pizarra cohort study. **Eur J Clin Invest** 2012; 42(1):79-85.

496. Goto A, Chen BH, Song Y, et al. Age, body mass, usage of exogenous estrogen, and lifestyle factors in relation to circulating sex hormone-binding globulin concentrations in postmenopausal women. **Clin Chem** 2014; 60(1):174-185.
497. Nayeem F, Nagamani M, Anderson KE, Huang Y, Grady JJ, Lu LJ. Dietary beta-tocopherol and linoleic acid, serum insulin, and waist circumference predict circulating sex hormone-binding globulin in premenopausal women. **J Nutr** 2009; 139(6):1135-1142.
498. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Prog Lipid Res** 2004; 43(2):91-104.
499. Vinknes KJ, Elshorbagy AK, Drevon CA, et al. Associations between plasma polyunsaturated fatty acids, plasma stearoyl-CoA desaturase indices and body fat. **Obesity (Silver Spring)** 2013; 21(9):E512-519.
500. Kotronen A, Seppanen-Laakso T, Westerbacka J, et al. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. **Diabetes** 2009; 58(1):203-208.
501. Sampath H, Ntambi JM. The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. **Ann N Y Acad Sci** 2011; 1243:47-53.
502. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. **Diabetologia** 2001; 44(3):312-319.
503. Warensjo E, Riserus U, Gustafsson IB, Mohsen R, Cederholm T, Vessby B. Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention. **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 2008; 18(10):683-690.
504. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **J Gastroenterol Hepatol** 2009; 24(5):830-840.
505. Fan B, Ikuyama S, Gu JQ, et al. Oleic acid-induced ADRP expression requires both AP-1 and PPAR response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2009; 297(1):E112-123.
506. Kang OH, Kim SB, Seo YS, et al. Curcumin decreases oleic acid-induced lipid accumulation via AMPK phosphorylation in hepatocarcinoma cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2013; 17(19):2578-2586.
507. Liao CC, Ou TT, Huang HP, Wang CJ. The inhibition of oleic acid induced hepatic lipogenesis and the promotion of lipolysis by caffeic acid via up-regulation of AMP-activated kinase. **J Sci Food Agric** 2014; 94(6):1154-1162.
508. Yao HR, Liu J, Plumeri D, et al. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. **Am J Transl Res** 2011; 3(3):284-291.
509. Priore P, Cavallo A, Gnoni A, Damiano F, Gnoni GV, Siculella L. Modulation of hepatic lipid metabolism by olive oil and its phenols in nonalcoholic fatty liver disease. **IUBMB Life** 2015; 67(1):9-17.
510. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr Rev** 1999; 20(5):649-688.
511. Wahli W, Devchand PR, A IJ, Desvergne B. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents regulate gene expression through direct binding to peroxisome proliferator-activated receptors. **Adv Exp Med Biol** 1999; 447:199-209.
512. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Mol Cell** 1999; 3(3):397-403.
513. Georgiadi A, Kersten S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. **Adv Nutr** 2012; 3(2):127-134.
514. Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89(10):4653-4657.

515. Acin S, Navarro MA, Perona JS, et al. Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. **J Nutr Biochem** 2007; 18(6):418-424.
516. Deng X, Elam MB, Wilcox HG, et al. Dietary olive oil and menhaden oil mitigate induction of lipogenesis in hyperinsulinemic corpulent JCR:LA-cp rats: microarray analysis of lipid-related gene expression. **Endocrinology** 2004; 145(12):5847-5861.
517. Hussein O, Grosovski M, Lasri E, Svalb S, Ravid U, Assy N. Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. **World J Gastroenterol** 2007; 13(3):361-368.
518. Assy N, Nassar F, Nasser G, Grosovski M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol** 2009; 15(15):1809-1815.
519. Soriguer F, Morcillo S, Cardona F, et al. Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. **J Nutr** 2006; 136(9):2325-2330.
520. Sato K, Arai H, Mizuno A, et al. Dietary palatinose and oleic acid ameliorate disorders of glucose and lipid metabolism in Zucker fatty rats. **J Nutr** 2007; 137(8):1908-1915.
521. Garcia-Escobar E, Soriguer F, Garcia-Serrano S, et al. Dietary oleic acid and adipocyte lipolytic activity in culture. **J Nutr Biochem** 2008; 19(11):727-731.
522. Natali F, Siculella L, Salvati S, Gnoni GV. Oleic acid is a potent inhibitor of fatty acid and cholesterol synthesis in C6 glioma cells. **J Lipid Res** 2007; 48(9):1966-1975.
523. Santiago-Mora R, Casado-Diaz A, De Castro MD, Quesada-Gomez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. **Osteoporos Int** 2011; 22(2):675-684.
524. Arbones-Mainar JM, Ross K, Rucklidge GJ, et al. Extra virgin olive oils increase hepatic fat accumulation and hepatic antioxidant protein levels in APOE^{-/-} mice. **J Proteome Res** 2007; 6(10):4041-4054.
525. Portillo MP, Chavarri M, Duran D, Rodriguez VM, Macarulla MT. Differential effects of diets that provide different lipid sources on hepatic lipogenic activities in rats under ad libitum or restricted feeding. **Nutrition** 2001; 17(6):467-473.
526. Takeuchi H, Nakamoto T, Mori Y, et al. Comparative effects of dietary fat types on hepatic enzyme activities related to the synthesis and oxidation of fatty acid and to lipogenesis in rats. **Biosci Biotechnol Biochem** 2001; 65(8):1748-1754.
527. Ferramosca A, Savy V, Zara V. Olive oil increases the hepatic triacylglycerol content in mice by a distinct influence on the synthesis and oxidation of fatty acids. **Biosci Biotechnol Biochem** 2008; 72(1):62-69.
528. Siculella L, Sabetta S, Damiano F, Giudetti AM, Gnoni GV. Different dietary fatty acids have dissimilar effects on activity and gene expression of mitochondrial tricarboxylate carrier in rat liver. **FEBS Lett** 2004; 578(3):280-284.

ANEXO

Sex Hormone Binding Globulin is a New Therapeutic Target against NAFLD

CRISTINA SAEZ-LOPEZ¹, ANNA BARBOSA-DESONGLES¹, CRISTINA HERNANDEZ¹,
ROGER A DYER², SHEILA M INNIS^{2†}, RAFAEL SIMÓ¹ AND DAVID M. SELVA^{1‡}

¹*Diabetes and Metabolism Research Unit, Vall Hebron Institut de Recerca (VHIR). Universitat Autònoma de Barcelona and CIBERDEM (ISCIII), Barcelona, Spain*

²*Child and Family Research Institute, Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada.*

† **Died February 19th, 2016.**

‡ **Address Correspondence to:**

David M Selva, Ph.D.

Diabetes and Metabolism Research Unit.

Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)

Pg Vall d'Hebron 119-129

08035 Barcelona, Spain

Tel: 93-489-4198

Fax: 93-489-4205

Email: david.martinez.selva@vhir.org

Running Title: SHBG protects against NAFLD

Low plasma SHBG levels are a hallmark in chronic metabolic diseases, including NAFLD, but the functional link between altered SHBG production and NAFLD development and progression remains unclear. We investigated the effects of overexpressing human SHBG in two different mouse models of NAFLD, a genetically-induced double transgenic mouse and a diet-induced model. Remarkably, SHBG overexpression in both NAFLD models significantly reduced liver fat accumulation by reducing key lipogenic enzymes. These findings were corroborated by modulating SHBG expression, suggesting the cell autonomous nature of the mechanism. Mechanistically, PPAR γ could be involved in SHBG effect on lipogenesis since its levels were downregulated by SHBG overexpression in the genetically-induced double transgenic mouse model of NAFLD. Taking together, we found for the first time that SHBG modulates hepatic lipogenesis. Our results point-out SHBG as a new therapeutic target whereby increased expression may reduce NAFLD.

Keywords: lipogenesis / non-alcoholic fatty liver disease / obesity / SHBG / ERK MAPK / transgenic mice.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one cause of fatty liver, occurring when fat is deposited (steatosis) in the liver not due to excessive alcohol use¹. The prevalence of NAFLD in the general population of Western countries is 20-30%. The increased prevalence of diabetes and obesity in the general population is considered to be the most common cause for NAFLD². Several studies have shown that obese subjects, type 2 diabetic (T2D) patients and individuals with NAFLD have low sex hormone-binding globulin (SHBG) levels³⁻⁵, a protein produced by the liver which acts as a carrier of sex steroids and regulates their bioavailability at the tissue level⁶.

Apart from the increase in lipogenesis that drives fat accumulation in the liver¹, there are extensive evidences supporting a central role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and other proinflammatory cytokines in the development of NAFLD^{7,8}. Moreover, TNF- α plasma levels have been found elevated in patients suffering NAFLD^{9,10}. We have previously demonstrated that an increase in hepatic lipogenesis and proinflammatory cytokines, such as TNF- α , downregulated SHBG production by decreasing hepatic HNF-4 α levels, a key regulator of *SHBG* transcription¹¹⁻¹³. Therefore, lipid accumulation and low grade inflammation present in NAFLD could be a common link explaining the low circulating SHBG levels in this disease. The latter raises the intriguing question of whether low SHBG could contribute to the progression of NAFLD, rather than simply being a consequence and a surrogate biomarker.

To address the importance of SHBG expression in NAFLD *in vivo*, we decided to overexpress SHBG in two different mouse models of NAFLD, a genetically-modified double transgenic mouse (SHBG-C57BL/ksJ-*db/db*), resulting from crossing the C57BL/ksJ-*db/db* mouse, a well-established model of NAFLD¹⁴ with the human *SHBG* transgenic mice, and a diet-induced model using the human *SHBG* transgenic mice and their wild-type littermates fed with a high fructose diet (HFrd). The SHBG overexpression in both NAFLD models significantly reduced liver fat accumulation by reducing key lipogenic enzymes. The cell autonomous effects of SHBG on hepatic lipogenesis were demonstrated in HepG2 cells, by modulating SHBG expression (overexpression or underexpression). Moreover, we

have preliminary data regarding the molecular mechanism by which SHBG reduced the hepatic lipogenesis, which involved PPAR γ .

Overall, our results suggest that SHBG protects against NAFLD development. More specifically, rather than being merely surrogate marker, SHBG plasma levels regulate hepatic lipogenesis through PPAR γ modulation, this is of importance since reduction of SHBG plasma levels in obese and T2D subjects could be directly associated with NAFLD development through an increase in hepatic lipogenesis. Our results point to SHBG as a new therapeutic target for preventing or arresting NAFLD development.

RESULTS

SHBG overexpression reduces liver weight and lipid accumulation in SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice

Previous studies have reported that C57BL/ksJ-db/db mice, a well-established model of NAFLD, have increased liver weight and hepatic lipid accumulation¹⁴. We confirmed these results in the characterization of our new mouse model, since we observed a significantly higher liver weight in obese male and female C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with their lean C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+ littermates (**Fig 1a and 1b**). Importantly, SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice had significantly reduced liver weight when compared with C57BL/ksJ-db/db mice (**Fig 1a**).

Histological analysis of livers from male and female mice revealed normal histology in lean C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (**Fig 1c and 1d**), while obese C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db showed hepatic lipid accumulation (**Fig 1c and 1d**). Male and female SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice also showed hepatic lipid accumulation, although lower than C57BL/ksJ-db/db mice (**Fig 1c and 1d**). Analysis of the liver total TG content showed that male and female lean C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice had less TG than their obese C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db littermates (**Fig 1e and 1f**). Remarkably, both male and female SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice showed lower liver TG accumulation than C57BL/ksJ-db/db mice (**Fig 1e and 1f**).

To rule out potential effects of testosterone on hepatic protection against lipid accumulation, we repeated the experiments with castrated SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice. Our results showed that castrated SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice had similar liver weights than non-castrated SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice (**Fig 1g**). The liver histological analysis revealed that castrated SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice were also partially protected against hepatic lipid accumulation both by histological and biochemical analysis (**Fig 1h and 1i**).

SHBG overexpression downregulates key lipogenic enzymes in SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice

To elucidate the molecular mechanism(s) by which SHBG overexpression protected against lipid accumulation we decided to perform microarray analyses to detect the differential expressed genes between C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db livers. We focused our attention on the molecular pathways related to lipogenesis, lipid export and fatty acid oxidation (**Supplementary table 1**). Lipogenic related pathways had a high number of genes affected, while in lipid export or fatty acid oxidation pathways the number of genes affected was lower. We therefore analyzed pathways which included lipid synthesis, lipid concentration, lipid homeostasis, fatty acid synthesis, fatty acid concentration, fatty acid metabolism, TG synthesis and TG concentration (**Supplementary tables 2-9**). The results showed an increase in downregulated genes in all the lipogenic-related pathways in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice (**Supplementary tables 2-9**). A total of 54 different genes were downregulated in SHBG-C57BL/ksJ-db/db when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice (**Supplementary tables 2-9**).

Among the downregulated genes in SHBG-C57BL/ksJ-db/db vs C57BL/ksJ-db/db we found three key genes regulating hepatic lipogenesis, such as ACC, FAS and ACLY¹⁵⁻¹⁷. Therefore, we analyzed the ACC, FAS and ACLY mRNA and protein levels of lean (C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+) and obese (C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db) male and female mice. Our results showed that obese C57BL/ksJ-db/db had significantly higher ACC, FAS and ACLY mRNA levels than lean C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice in both males (**Fig 2a**) and females (**Fig 2b**). However, SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice showed significant lower ACC, FAS and ACLY mRNA levels (**Fig 2a and 2b**) than C57BL/ksJ-db/db mice. Moreover, we found that ACC,

FAS and ACLY protein levels were significantly higher in obese C57BL/ksJ-db/db when compared with lean C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+ mice, whereas SHBG-C57BL/ksJ-db/db had lower ACC, FAS and ACLY protein levels in both male and female mice (**Fig 2c and 2d**).

SHBG overexpression protects against HFrD-induced fatty liver disease

Since our findings with the humanized SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice point to SHBG as a factor that could protect from hepatic steatosis we next examined whether this protective effect could be exerted in a diet-induced model of NAFLD. To accomplish this, wild-type and human *SHBG* transgenic mice were fed with HFrD for 8 weeks.

The liver histological examination revealed that wild-type mice developed hepatic steatosis while human *SHBG* transgenic mice did not (**Fig 3a i and 3a ii**). Importantly, livers from human *SHBG* transgenic mice showed approximately 3-fold less TG content than wild-type mice (**Fig 3b**). Analysis of the hepatic ACC, FAS and ACLY mRNA and protein levels from these mice showed an important suppression in ACC, FAS and ACLY mRNA and protein levels in the human *SHBG* transgenic mice in comparison to wild-type mice littermates (**Fig 3c-3h**).

SHBG modulates hepatic lipogenesis in HepG2 cells

We first analyzed the effects of under or over expression of SHBG on lipogenesis and TG accumulation in HepG2 cells. The results showed that SHBG overexpression (pCMV-SHBG) led to a significant increase in SHBG mRNA and protein production in HepG2 cells (**Fig 4a and 4b**). In contrast, SHBG underexpression (pLKO.1-SHBG) led to a significant decrease in SHBG mRNA and protein production in HepG2 cells (**Fig 4d and 4e**).

We next analyzed the total triglyceride content of the SHBG overexpressing and underexpressing HepG2 cells. The results showed that the cells overexpressing SHBG had significantly lower TG (**Fig 4c**), while cells underexpressing SHBG had significantly higher TG (**Fig 4f**) when compared with their respective controls (pCMV and pLKO.1).

Moreover, the analysis of the mRNA expression abundance of ACC, FAS and ACLY, crucial enzymes involved in hepatic lipogenesis, showed that cells overexpressing SHBG had reduced ACC,

FAS and ACLY mRNA levels (**Fig 4g, 4h and 4i**), while cells underexpressing SHBG had higher ACC, FAS and ACLY mRNA levels when compared with their respective controls (pCMV and pLKO.1) (**Fig 4j, 4k and 4l**). Furthermore, ACC and ACLY, but not FAS, protein levels were reduced in overexpressing SHBG cells and increased in underexpressing SHBG cells when compared with their respective controls (pCMV and pLKO.1) (**Fig. 5**).

PPAR γ levels are downregulated by SHBG overexpression in SHBG-db/db mice in comparison to db/db mice.

We next wanted to elucidate the molecular mechanism by which SHBG overexpression inhibits all three key lipogenic enzymes. In this regard, it is well established in the literature that there are several key transcription factors regulating hepatic lipogenesis, such as SREBP, LXR α or PPAR γ ^{18,19} (**Supplementary table 10**). We therefore analyzed if these transcription factors were differentially expressed in our microarray analysis between C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db livers. The results showed that only PPAR γ mRNA levels were downregulated in livers from SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with C57BL/ksJ-db/db mice. Furthermore, we analyzed the PPAR γ mRNA and protein levels from C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db livers. The results showed a clear and significant reduction in both PPAR γ mRNA and protein levels in SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with C57BL/ksJ-db/db mice (**Fig. 6a and 6b**).

DISCUSSION

The most well known role of SHBG is as a carrier protein that transports sex steroids through the blood and regulates their bioavailability and accessibility to the target tissues and cells⁶. Circulating SHBG is altered in metabolic disorders^{22,23} with low plasma SHBG levels being considered a risk factor for developing T2D and cardiovascular disease²⁴⁻²⁸. NAFLD is one of the

metabolic diseases associated with low plasma SHBG levels²⁹. It is important to mention that from the total plasmatic SHBG protein in humans, 20% in male and 50% in female is unoccupied²². Whether this excess of unbound protein has a different biological function(s) is currently unknown. In the present study, we point-out that low plasma SHBG levels present in metabolic disorders could play a role in development of these diseases. Specifically, we have demonstrated that SHBG overexpression protects against NAFLD development in a genetically and a diet-induced mouse models by reducing hepatic lipogenesis. Importantly, our results suggest that SHBG downregulation mediated by hepatic lipid accumulation and increased proinflammatory cytokines found in obesity and T2D may accelerate NAFLD development, which in turn will further reduce SHBG production (**Fig. 7**).

NAFLD, characterized by an increase in hepatic TG content, is usually found in obese subjects³⁰. We studied the effect of human SHBG overexpression on hepatic TG synthesis and accumulation using two mouse models, a genetically and a diet-induced models of NAFLD. The obese C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice showed increased fatty liver when compared with their lean littermates (C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/+), while obese SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice clearly had less hepatic steatosis. We also showed the beneficial effects of overexpressing SHBG in the development of NAFLD induced by a HFrD. Importantly, human *SHBG* transgenic mice did not develop hepatic steatosis when compared with wild-type mice after 8 week of HFrD feeding. These findings point to SHBG as a protective factor against diet-induced NAFLD.

The testosterone role in NAFLD has been studied in humans with contradictory results. While 18 weeks of testosterone therapy alleviated fatty liver in men³¹, a later study showed no beneficial effects of testosterone in ageing men³². The fact that males and females showed similar hepatic protection against NAFLD in our humanized SHBG-C57BL/ksJ-db/db mouse model indicates that SHBG was important in protecting against hepatic lipid accumulation in this model, regardless of testosterone levels. However, it has been reported that the presence of SHBG in the blood of the human *SHBG* transgenic male mice led to serum testosterone levels 10 to 100 times higher than their wild-type littermates³³. This important difference in total testosterone levels has also been found in our SHBG- C57BL/ksJ-db/db mouse model³⁴. Nevertheless, the histological and biochemical analysis of

liver lipid accumulation in castrated SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice provides strong evidence that SHBG itself protects against lipid accumulation independently of testosterone serum levels. Consistent with our results, low plasma SHBG levels, but not total testosterone or free testosterone was associated with NAFLD in T2D patients³⁵. These findings strongly suggest that SHBG has functions independent of sex steroids and open up a new role of SHBG under physiological and pathological conditions.

To elucidate the molecular mechanisms associated with this SHBG protection against NAFLD, we analyzed the differentially expressed genes between livers of C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice by microarray analyses. We found a clear downregulation of a number of pathways involved in hepatic lipogenesis. Other lipid-related pathways, such as lipid export and fatty acid oxidation, were also explored but the number of genes affected was lower. Among the lipogenic genes we found ACC, FAS and ACLY, three key enzymes of hepatic lipogenesis¹⁵⁻¹⁷. It should be noted that mice lacking ACC, FAS or ACLY are protected against weight gain and hepatic steatosis^{17,36,37}. We found a significant reduction of ACC, FAS and ACLY mRNA and protein levels in livers of SHBG-C57BL/ksJ-db/db when compared with C57BL/ksJ-db/db. Importantly, similar results were found in livers of human *SHBG* transgenic mice compared with wild-type mice fed with the HFrD, suggesting that SHBG overexpression reduces liver fat accumulation by reducing lipogenesis. This suggestion was further supported by the results that showed in our two NAFLD models that SHBG overexpression reduced hepatic TG content. In this regard, it has been recently shown that liver fat, but not visceral fat or total body fat, is an independent predictor of SHBG levels, with a strong association between a decrease in liver fat due to lifestyle intervention and an increase of plasma SHBG levels³⁸. Importantly, our results suggest that higher hepatic SHBG production itself may participate in reducing hepatic lipid accumulation by reducing lipogenesis. The latter hypothesis is supported by our *in vitro* studies using HepG2 cells in which TG content was altered in concert with changes in ACC, FAS and ACLY by the modulation of SHBG production. These results suggested that SHBG could be an autocrine factor regulating hepatic lipogenesis (**Fig. 7**).

To understand how SHBG overexpression was downregulating ACC, FAS and ACLY we went back to our microarray data looking for a key transcription factor altered in our SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice. We found that PPAR γ mRNA and protein levels were reduced in SHBG overexpressing mice. These results are in agreement with the fact that PPAR γ is expressed at elevated levels in the liver of a number of mouse models of diabetes or obesity, and that hepatic disruption of PPAR γ resulted in a clear downregulation of ACC, FAS and ACLY mRNA levels³⁹.

Overall, our results point to SHBG as a new therapeutic target whereby increased expression may protect against NAFLD development and progression. Even if SHBG does not become a feasible therapeutic target, our findings provide clear evidences that explain why obese and type 2 diabetic subjects, two conditions which are characterized by low plasma SHBG levels, develop NAFLD. Equally important, our results demonstrated for the first time that SHBG is more than a simple biomarker with novel data highly indicative of the SHBG importance in regulating hepatic lipogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals. The human *SHBG* transgenic mice were backcrossed onto C57BL/ksJ-db/db background in order to obtain mice expressing human *SHBG* and developing obesity and NAFLD. These mice have been previously described³⁴. Mice were maintained under standard conditions with food (Global Diet 2018, Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain) and water provided *ad libitum* and a 12h light/dark cycle. Experimental procedures were approved by the Institutional Animal Use Subcommittees of UHVH Research Institute and the Universitat Autònoma Barcelona (45/13 CEEA).

In vivo experiments. Male and female mice of the four genotypes (C57BL/ksJ-db/+, C57BL/ksJ-db/db, SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/db) n=5 each were sacrificed at 6 weeks of age and blood and tissues were collected and weighted for RNA and protein isolation.

Human *SHBG* transgenic and wild-type mice (n=5) were fed during 8 weeks with a semisynthetic diet containing 20% protein, 4% soybean fat and 76% fructose. At the end of the study mice were sacrificed and blood and tissues were collected for RNA and protein isolation.

Cell culture experiments. Cell culture reagents were from Life Technologies Inc (Invitrogen SA, Barcelona, Spain). HepG2 hepatoblastoma cells (catalog no. HB-8065; ATCC) were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. HepG2 cells overexpressing or underexpressing SHBG were achieved by stable transfection using an SHBG expression vector (pCMV-SHBG) or a vector expressing siRNA against SHBG (pLKO.1-SHBG from Sigma-Aldrich SL, Madrid, Spain). An empty vector (pCMV) and a pLKO.1 containing random sequences (pLKO.1-Control) were used as controls, respectively. The pCMV and pCMV-SHBG vectors were kindly provided by Dr. Geoffrey Hammond, UBC, Canada) while pLKO.1-Control was kindly provided by Dr. Josep Villena, VHIR, Spain). All transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen SA). Transfected HepG2 cells were selected for 10 days by treating with G418 (750 $\mu\text{g/ml}$). Purified SHBG from human plasma (Abyntek Biopharma SL, Bizkaia, Spain) was used to treat HepG2 cells.

Histology. For morphological studies, 3 animals of each genotype (C57BL/ksJ-db/+, C57BL/ksJ-db/db, SHBG-C57BL/ksJ-db/+ and SHBG-C57BL/ksJ-db/db) were used. From the diet study, wild-type and human *SHBG* transgenic mice (n=3 each) were also analyzed. Livers were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h and embedded in paraffin. Serial 5- μm thick sections were used for histological examination and stained with hematoxylin-eosin (H&E).

SHBG measurements. Human SHBG levels from HepG2 cell culture media and from mouse plasma were measured using an ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH).

Liver triglycerides. Mouse liver and HepG2 cells triglycerides were measured using a triglyceride assay kit (Cat.#K622-100 BioVision Inc., CA, US) following the manufacturer's instructions.

RNA analysis. Total RNA was extracted from HepG2 cells and mouse liver samples using TRIzol reagent (Invitrogen SA). Reverse transcription (RT) was performed at 42 °C, for 50 min using 3 μg of total RNA and 200 U of Superscript II together with an oligo-dT primer and reagents provided by Invitrogen. An aliquot of the RT product was amplified in a 25- μl reaction using SYBRGreen

(Invitrogen SA) with appropriate oligonucleotide primer pairs corresponding to human SHBG, ACC, FAS, ACLY, PPARG and 18S, and mouse ACC, FAS, ACLY, PPARG and 18S (**Supplementary Table 11**). Results were analyzed using the 7000 SDS program.

For microarrays analysis mRNA liver samples from db/db and SHBG-db/db mice were isolated using the RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74104, QIAGEN, Madrid, Spain) following the manufacturer instructions.

Western Blot Analysis. HepG2 cells and mouse liver samples were homogenized in RIPA buffer with Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). Protein extracts were used for western blotting with antibodies against FAS (catalog 22759, Abcam, Cambridge, UK), ACC (catalog 63531, Abcam), ACLY (catalog 4332, cell signalling, Barcelona, Spain), PPAR γ (H-100, catalog sc-7196, Santacruz Biotechnologies), P-PPAR γ (catalog 4888, Biossusa), P-ERK-1/2 (catalog 9101, cell signalling) and PPIA (SA-296; BIOMOL Int., Madrid, Spain). Specific antibody-antigen complexes were identified using the corresponding HRP-labeled goat anti-rabbit IgG and chemiluminescent substrates (Millipore) by exposure to x-ray film. Quantification was performed using ImageJ free software.

Microarray hybridization and analysis. The goal of the study was to compare hepatic gene expression patterns between C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice. Microarrays were carried out using the Affymetrix microarray platform and the Genechip Mouse Gene 2.0 ST Array (an array with >35,000 coding and non-coding transcripts used to explore mouse biology and disease processes). The arrays were performed at the High Technology Unit of our Research Institute as described elsewhere (www.affymetrix.com). Data obtained from the microarrays were analyzed by the Statistics and Bioinformatics Unit of our research institute. To select differentially expressed genes they used a method described by Smyth GK⁴⁰. All the statistical analysis was done using the free statistical language R and the libraries developed for microarray data analysis by the Bioconductor Project (www.bioconductor.org). To determine pathways and networks that were significantly regulated we

performed pathway analysis using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) program (<http://www.ingenuity.com>).

Statistical analyses. Normal distribution of the variables was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparison of quantitative variables was performed by either the Student's *t* test or Mann-Whitney test according to the data distribution. All data are presented as means \pm standard deviation. Significance was accepted at the level of $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Geoffrey L. Hammond; Head of the Department of Cellular & Physiological Sciences, University of British Columbia, since this project would not have been possible without his collaboration in letting us use the human *SHBG* transgenic mice. We also thank Lorena Ramos, Research Institute Hospital Vall d'Hebron, for her technical assistance. We also would like to acknowledge Prof. Geoffrey L Hammond (University of British Columbia), Dr Josep Jimenez Chillaron (Hospital Sant Joan de Deu), Julian Ceron (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge) and Dr Josep Villena Delgado (Vall d'Hebron Research Institute) for the critical review of our manuscript. This work was supported by three Grants from the Instituto de Salud Carlos III (DMS) CP08/00058, PI09/144, PI12/01357 and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas an initiative of Instituto de Salud Carlos III (CSL, CH, RS and DMS). DMS is the recipient of a Miguel Servet II contract.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

CSL: researched data, contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. ABD: researched data, contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. CH: contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. RAD: researched data, contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. SI: researched data, contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. RS: research data, contributed to discussion, wrote manuscript, reviewed/edited manuscript. DMS: researched data, contributed to

discussion, wrote manuscript, reviewed/edited manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that no conflict of interest exists.

REFERENCES

1. Adams, L.A. & Lindor, K.D. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol* **17**, 863-9 (2007).

2. Das, K.S., Balakrishnan, V., Mukherjee, S. & Vasudevan, D.M. Evaluation of blood oxidative stress-related parameters in alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* **68**, 323-34 (2008).
3. Barrett-Connor, E., Khaw, K.T. & Yen, S.S. Endogenous sex hormone levels in older adult men with diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* **132**, 895-901 (1990).
4. de Moor, P. & Joossens, J.V. An inverse relation between body weight and the activity of the steroid binding -globulin in human plasma. *Steroidologia* **1**, 129-36 (1970).
5. Kopelman, P.G., Pilkington, T.R., White, N. & Jeffcoate, S.L. Abnormal sex steroid secretion and binding in massively obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)* **12**, 363-9 (1980).
6. Siiteri, P.K. et al. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res* **38**, 457-510 (1982).
7. Feldstein, A.E. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* **40**, 185-94 (2004).
8. Peraldi, P., Hotamisligil, G.S., Buurman, W.A., White, M.F. & Spiegelman, B.M. Tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* **271**, 13018-22 (1996).
9. Chu, C.J. et al. Risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese patients and the role of tumor necrosis factor- α . *Hepatogastroenterology* **54**, 2099-102 (2007).
10. Das, S.K. & Balakrishnan, V. Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. *Indian J Clin Biochem* **26**, 202-9 (2011).
11. Selva, D.M., Hogeveen, K.N., Innis, S.M. & Hammond, G.L. Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest* **117**, 3979-87 (2007).
12. Simo, R., Barbosa-Desongles, A., Lecube, A., Hernandez, C. & Selva, D.M. Potential role of tumor necrosis factor- α in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes* **61**, 372-82 (2012).
13. Simo, R. et al. Molecular Mechanism of TNF α -Induced Down-Regulation of SHBG Expression. *Mol Endocrinol* **26**, 438-46 (2012).
14. Boquist, L., Hellman, B., Lernmark, A. & Taljedal, I.B. Influence of the mutation "diabetes" on insulin release and islet morphology in mice of different genetic backgrounds. *J Cell Biol* **62**, 77-89 (1974).
15. Postic, C. & Girard, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* **118**, 829-38 (2008).
16. Takahashi, Y., Soejima, Y. & Fukusato, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **18**, 2300-8 (2012).
17. Wang, Q. et al. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology* **49**, 1166-75 (2009).
18. Foufelle, F. & Ferre, P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* **366**, 377-91 (2002).
19. Souza-Mello, V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* **7**, 1012-9 (2015).
20. Banks, A.S. et al. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR γ . *Nature* **517**, 391-5 (2015).

21. Burns, K.A. & Vanden Heuvel, J.P. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 952-60 (2007).
22. Hammond, G.L. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol Reprod* **85**, 431-41 (2011).
23. Pugeat, M., Crave, J.C., Tourniaire, J. & Forest, M.G. Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement. *Horm Res* **45**, 148-55 (1996).
24. Bonnet, F. et al. Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. *Eur J Endocrinol* **161**, 81-5 (2009).
25. Ding, E.L. et al. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med* **361**, 1152-63 (2009).
26. Haffner, S.M., Katz, M.S., Stern, M.P. & Dunn, J.F. Association of decreased sex hormone binding globulin and cardiovascular risk factors. *Arteriosclerosis* **9**, 136-43 (1989).
27. Karim, R., Hodis, H.N., Stanczyk, F.Z., Lobo, R.A. & Mack, W.J. Relationship between serum levels of sex hormones and progression of subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 131-8 (2008).
28. Sutton-Tyrrell, K. 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* **111**, 1242-9 (2005).
29. Shin, J.Y. 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* **94**, 156-62 (2011).
30. Matteoni, C.A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* **116**, 1413-9 (1999).
31. Hoyos, C.M. et al. Body compositional and cardiometabolic effects of testosterone therapy in obese men with severe obstructive sleep apnoea: a randomised placebo-controlled trial. *Eur J Endocrinol* **167**, 531-41 (2012).
32. Huang, G. et al. Effect of testosterone administration on liver fat in older men with mobility limitation: results from a randomized controlled trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**, 954-9 (2013).
33. Janne, M., Hogeveen, K.N., Deol, H.K. & Hammond, G.L. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. *Endocrinology* **140**, 4166-74 (1999).
34. Saez-Lopez, C., Rivera-Gimenez, M., Hernandez, C., Simo, R. & Selva, D.M. SHBG-C57BL/ksJ-db/db: A New Mouse Model to Study SHBG Expression and Regulation During Obesity Development. *Endocrinology* **156**, 4571-81 (2015).
35. Hua, X. et al. Low serum sex hormone-binding globulin is associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* **80**, 877-83 (2014).
36. Abu-Elheiga, L., Wu, H., Gu, Z., Bressler, R. & Wakil, S.J. Acetyl-CoA carboxylase 2-/- mutant mice are protected against fatty liver under high-fat, high-carbohydrate dietary and de novo lipogenic conditions. *J Biol Chem* **287**, 12578-88 (2012).
37. Chakravarthy, M.V. et al. "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab* **1**, 309-22 (2005).
38. Stefan, N., Schick, F. & Haring, H.U. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes. *N Engl J Med* **361**, 2675-6; author reply 2677-8 (2009).

39. Matsusue, K. et al. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* **111**, 737-47 (2003).
40. Smyth, G.K. & Altman, N.S. Separate-channel analysis of two-channel microarrays: recovering inter-spot information. *BMC Bioinformatics* **14**, 165 (2013).

FIGURE 1

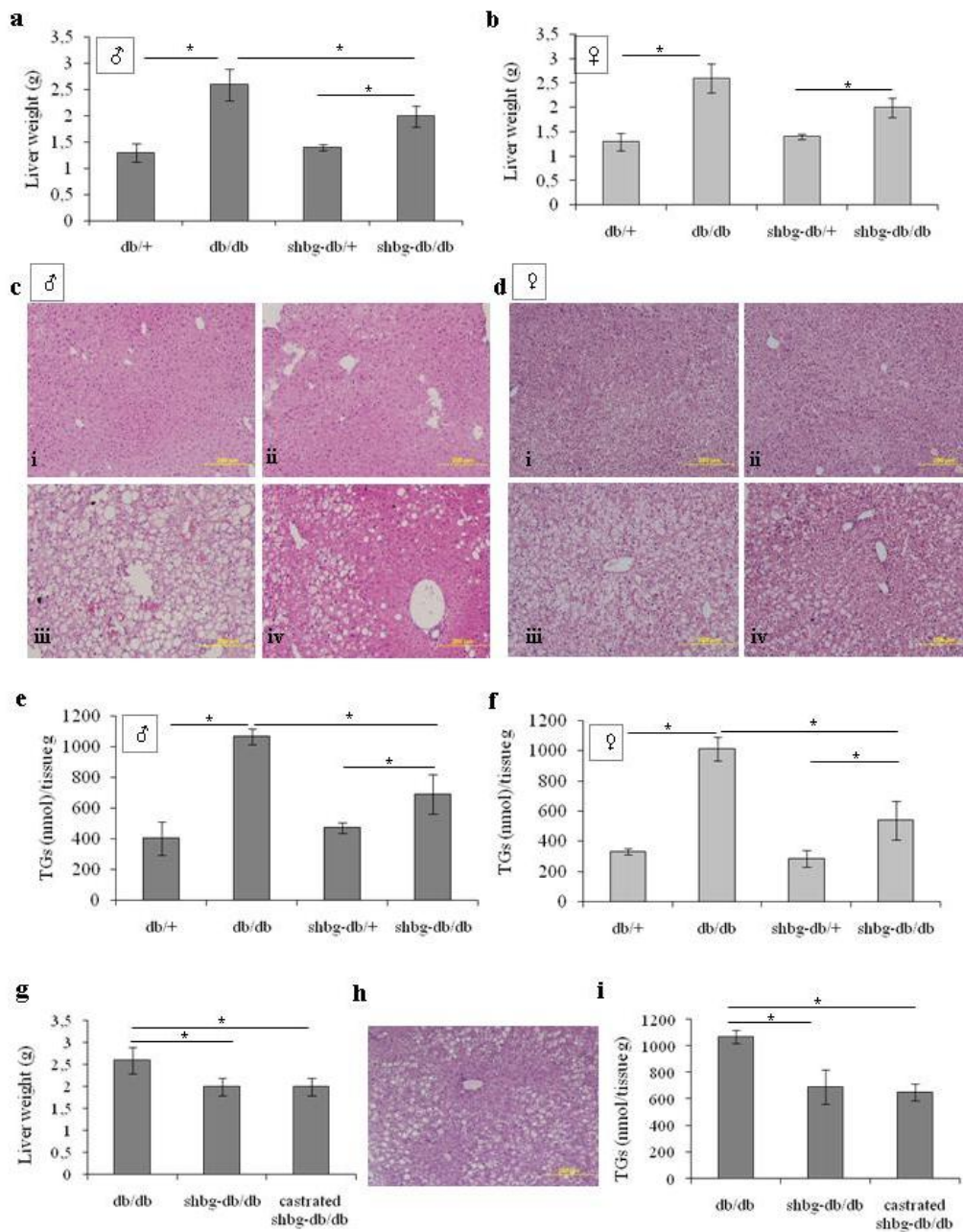


Figure 1. SHBG overexpression reduces liver weight and liver fat accumulation in SHBG- C57BL/ksJ-db/db mice. (a,b) Liver weight of C57BL/ksJ-db/+, SHBG-C57BL/ksJ-db/+, C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db male and female mice (n=5 each) sacrificed at week 6. Data points are mean \pm SEM. (c,d) H&E histological examination of liver in C57BL/ksJ-db/+ (i), SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (ii), C57BL/ksJ-db/db (iii) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db (iv) 6-week male and female mice (n=3 each). (e,f) Hepatic triglycerides measured in C57BL/ksJ-db/+ (i), SHBG-C57BL/ksJ-db/+ (ii), C57BL/ksJ-db/db (iii) and SHBG-C57BL/ksJ-db/db male and female mice (n=5 each). Data points are mean \pm SEM. (g) Liver weight of C57BL/ksJ-db/db, SHBG-C57BL/ksJ-db/db and castrated SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice sacrificed at week 6 (n=3 each). (h) H&E histological examination of liver in castrated SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice (n=3 each). (i) Hepatic triglycerides measured in C57BL/ksJ-db/db, SHBG-C57BL/ksJ-db/db and castrated SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice (n=3 each). Data points are mean \pm SEM. Significance was accepted at the level of $p < 0.05$ *.

FIGURE 2

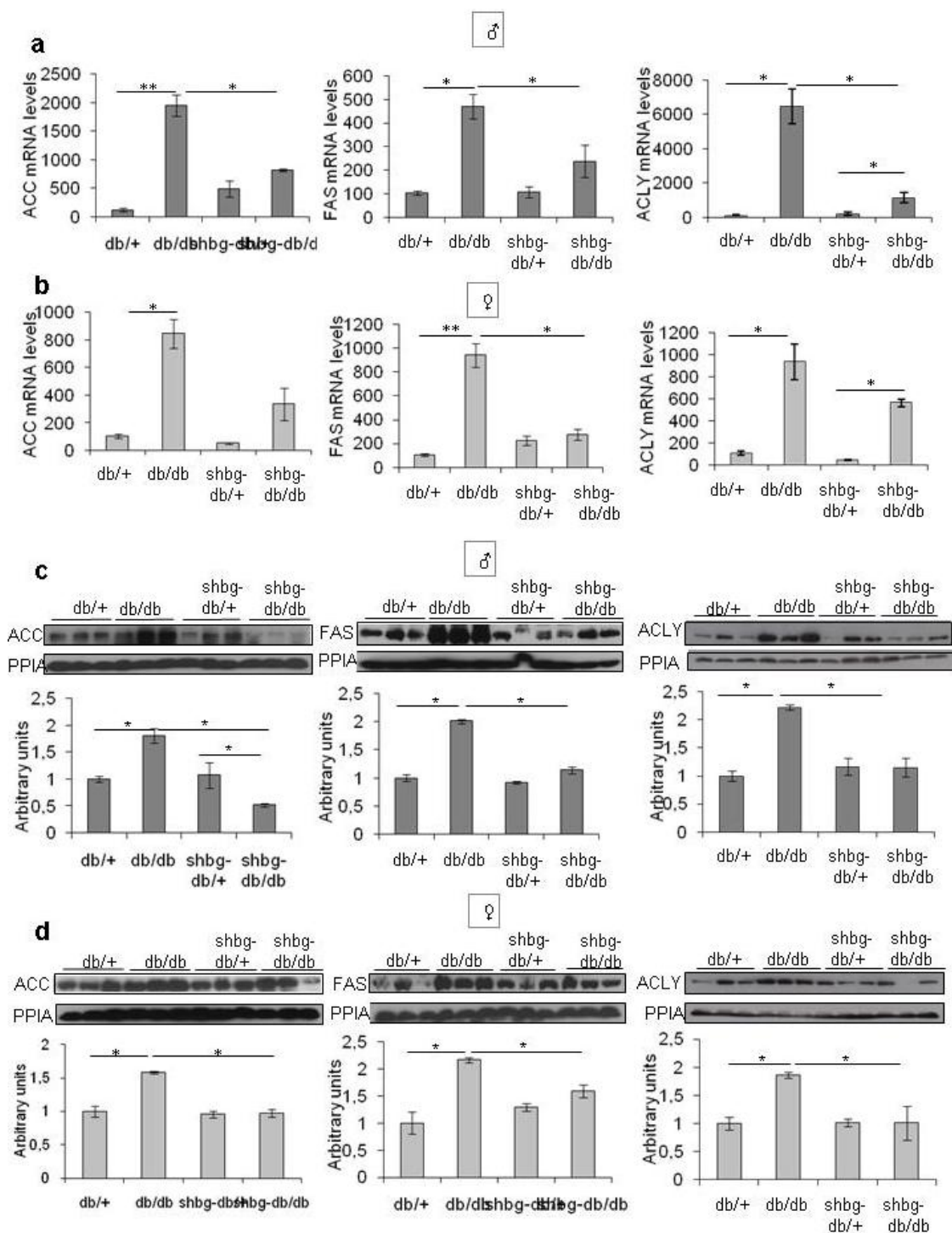


Figure 2. SHBG overexpression ameliorates hepatic steatosis by reducing key lipogenic enzymes in C57BL/ksJ-SHBG-db/db mice. (a,b) Liver ACC, FAS and ACLY mRNA levels were determined in relation to 18S RNA in C57BL/ksJ-db/+, SHBG-C57BL/ksJ-db/+, C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db male and female mice sacrificed at week 6 (n=5 each). Data points are mean \pm SEM. (c,d) Liver ACC, FAS and ACLY protein levels were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein in C57BL/ksJ-db/+, SHBG-C57BL/ksJ-db/+, C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db male and female mice (n=3 each). Data points are mean \pm SEM. Significance was accepted at the level of $p < 0.05^*$ and $p < 0.01^{**}$.

FIGURE 3

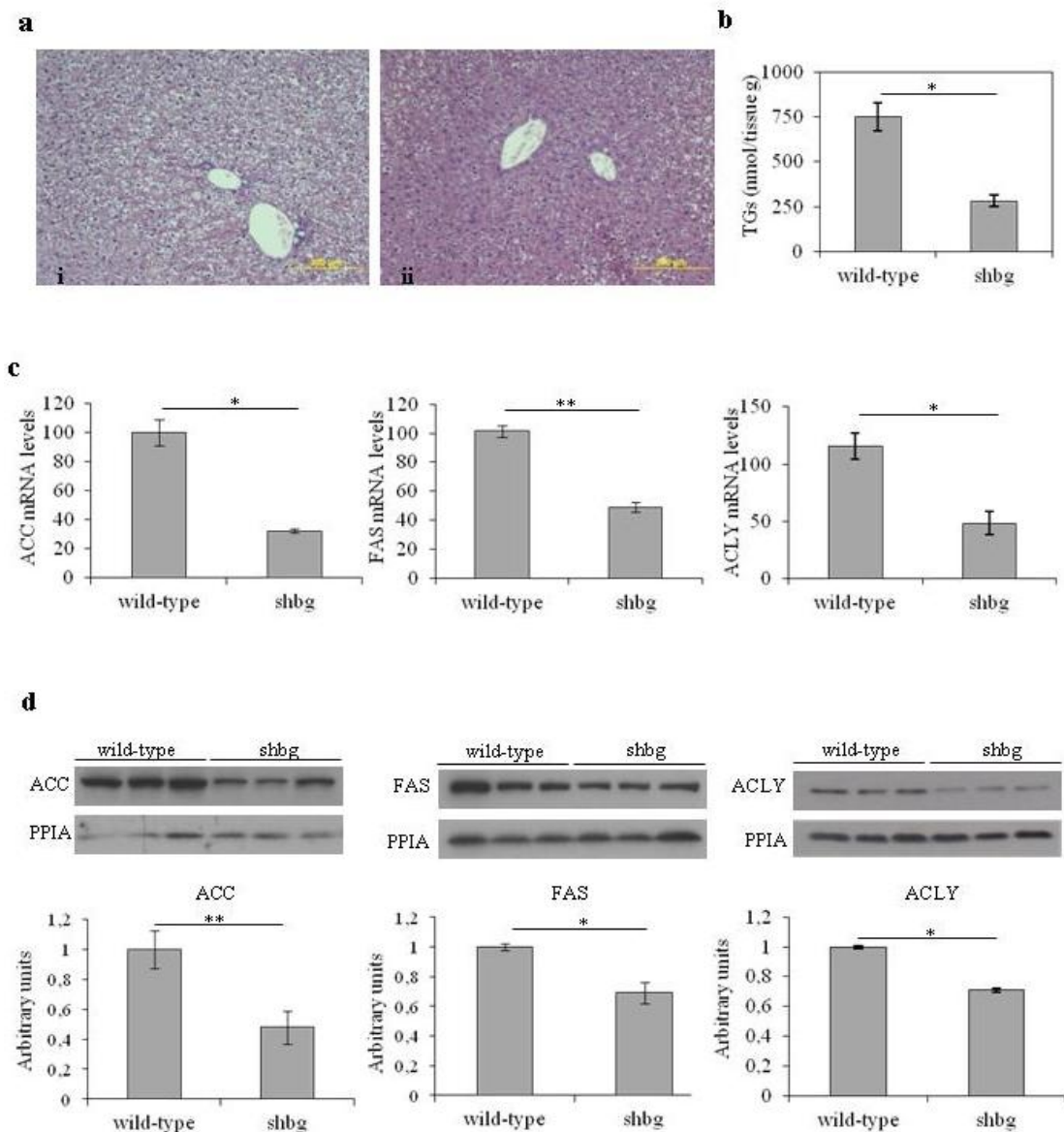


Figure 3. SHBG overexpression protects against fatty liver disease induced by high fructose diet. (a) H&E histological examination of liver in wild-type mice (i) and human *SHBG* transgenic mice (ii) after 8 weeks of high fructose diet. (b) Hepatic triglycerides measured in wild-type and human *SHBG* transgenic mice (n=5 each). Data points are mean \pm SEM. (c) Liver ACC, FAS and ACLY mRNA levels were determined in relation to 18S RNA in wild-type and human *SHBG* transgenic mice (n=5 each). Data points are mean \pm SEM. (d) Liver ACC, FAS and ACLY protein levels were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein in wild-type and human *SHBG* transgenic mice (n=3 each). Significance was accepted at the level of $p < 0.05^*$ and $p < 0.01^{**}$.

FIGURE 4

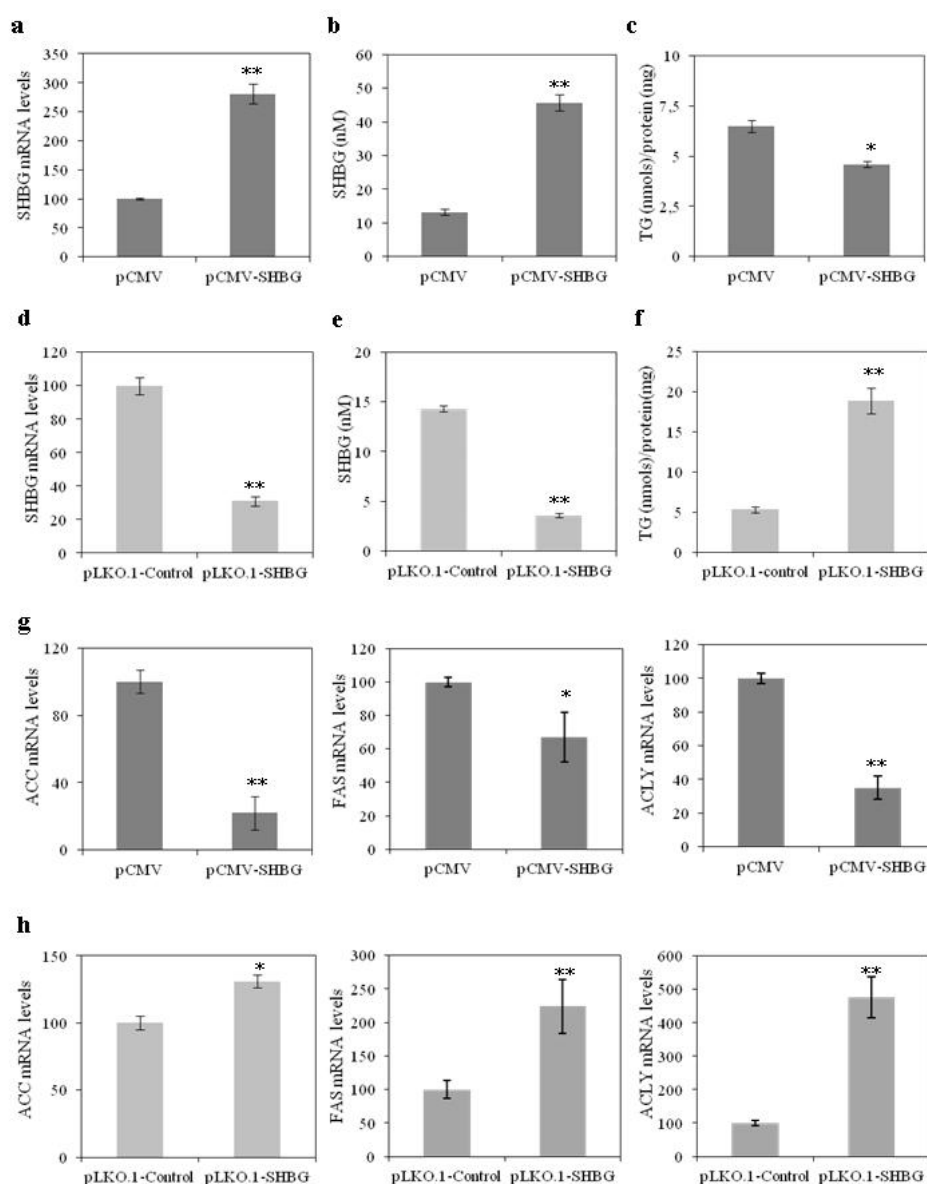
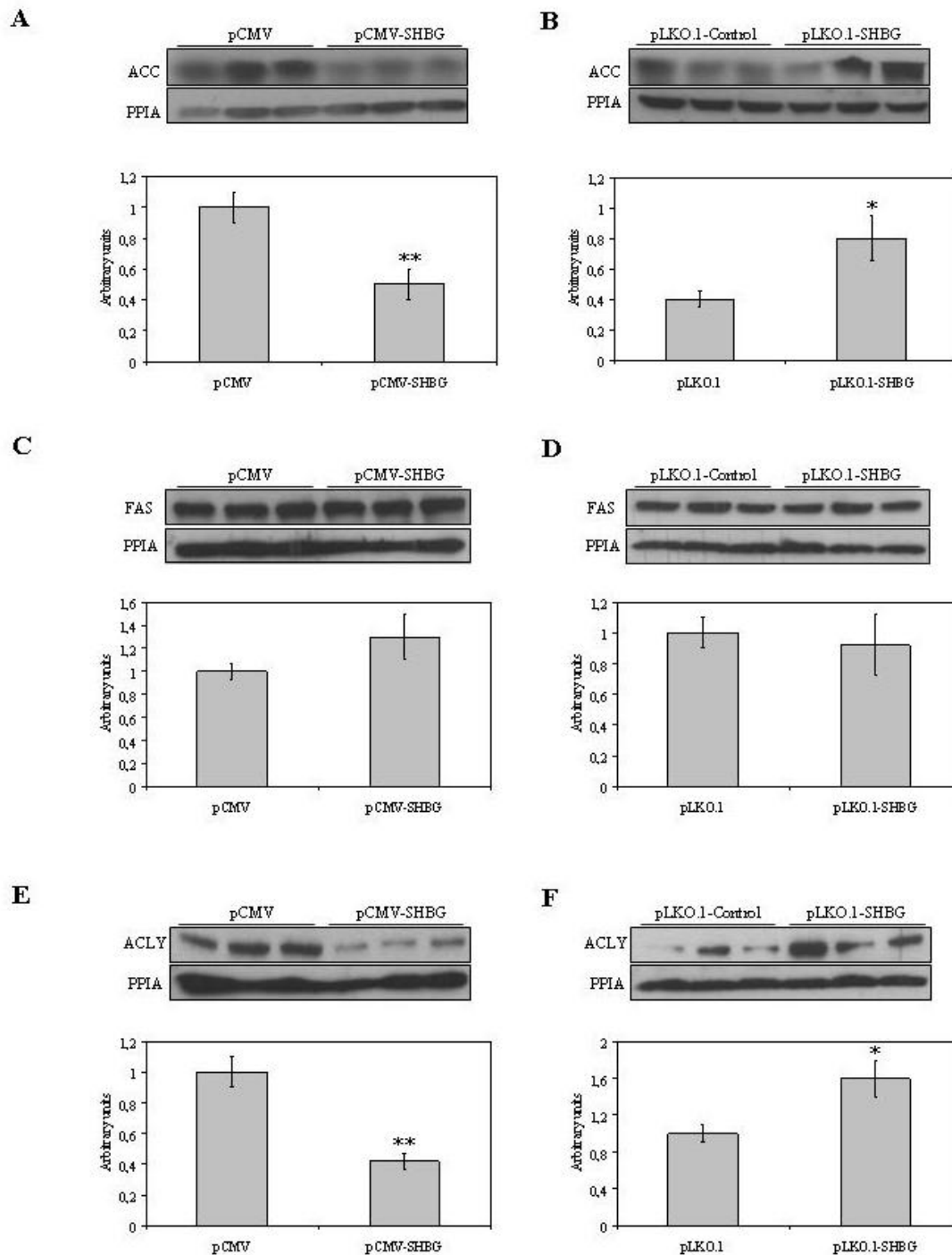


Figure 4. SHBG regulates hepatocyte lipid content by modulating key lipogenic enzymes in HepG2 cells. (a) SHBG mRNA levels were determined in relation to 18S RNA in pCMV and pCMV-SHBG stably transfected HepG2 cells. (b) SHBG accumulation in the medium was measured using an ELISA in pCMV and pCMV-SHBG stably transfected HepG2 cells. (c) Total triglyceride content measured in pCMV and pCMV-SHBG stably transfected HepG2 cells. (d) SHBG mRNA levels were determined in relation to 18S RNA in pLKO.1-Control and pLKO.1-SHBG stably transfected HepG2 cells. (e) SHBG accumulation in the medium was measured using an ELISA in pLKO.1-Control and pLKO.1-SHBG stably transfected HepG2 cells. (f) Total triglyceride content measured in pLKO.1-Control and pLKO.1-SHBG stably transfected HepG2 cells. (g) ACC, FAS and ACLY mRNA levels were determined in relation to 18S RNA in pCMV and pCMV-SHBG stably transfected HepG2 cells. (h) ACC, FAS and ACLY mRNA levels were determined in relation to 18S RNA in pLKO.1-Control and pLKO.1-SHBG stably transfected HepG2 cells. Data points are mean \pm SD of triplicate measurements. Significance was accepted at the level of $p < 0.05^*$ and $p < 0.01^{**}$.

FIGURE 5



SHBG modulation alters ACC and ACLY, but not FAS protein levels in HepG2 cells. (A, B) ACC protein levels were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein in pCMV and pCMV-SHBG and in pLKO.1-Control and pLKO.1-SHBG stably transfected HepG2 cells. (C, D) FAS protein levels were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein in pCMV and pCMV-SHBG and in pLKO.1-Control and pLKO.1-SHBG stably transfected HepG2 cells. (E, F) ACLY protein levels were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein in pCMV and pCMV-SHBG and in pLKO.1-Control and pLKO.1-SHBG stably transfected HepG2 cells. These data are representative of three protein measurements. Data points are mean \pm SD of triplicate measurements. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

FIGURE 6

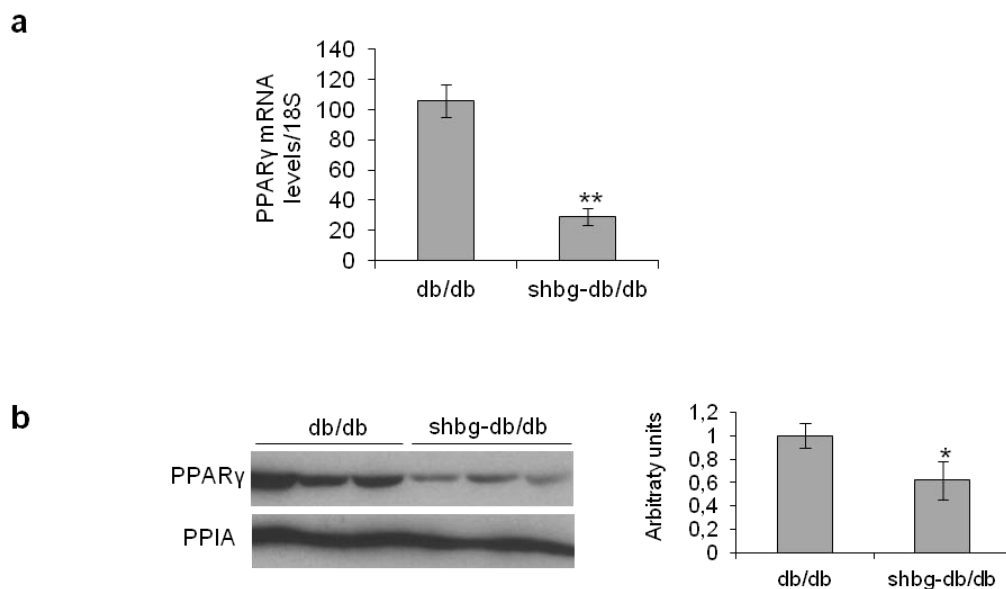


Figure 6. SHBG overexpression downregulates PPAR γ levels in the genetically and diet-induced models of NAFLD. (a) Liver PPAR γ mRNA levels were determined in relation to 18S RNA in C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice (n=5 each). Data points are mean \pm SEM. (c) Liver PPAR γ protein levels were measured by Western blotting using PPIA as a housekeeping reference protein in C57BL/ksJ-db/db and SHBG-C57BL/ksJ-db/db male mice (n=3 each). Data points are mean \pm SEM. Significance was accepted at the level of $p < 0.05^*$ and $p < 0.01^{**}$.

FIGURE 7

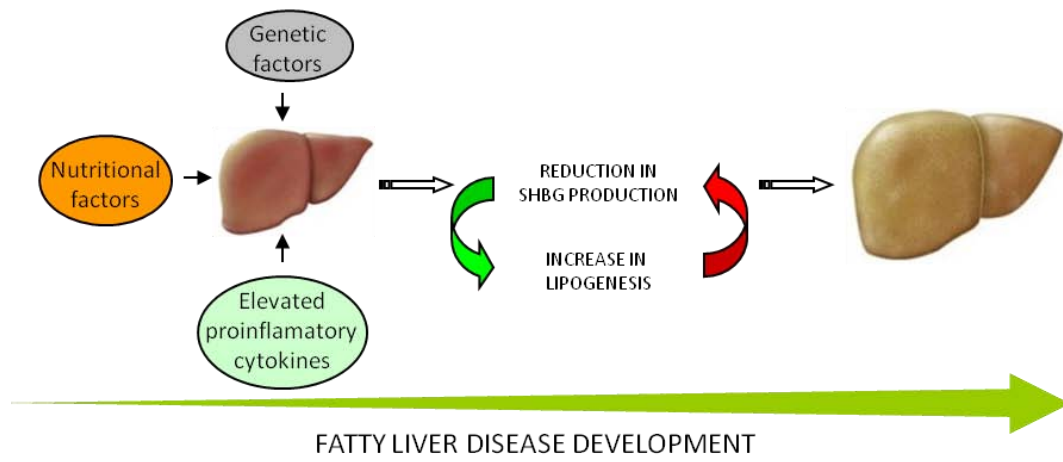


Figure 7. SHBG role in the development of NAFLD. The reduction in SHBG production due to different factors will promote the hepatic lipid accumulation which in turn will further reduce the SHBG production.

Supplementary table 1. List of genes up and down-regulated from fatty acid oxidation and lipid export in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Pathway	Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
					upreg	downr
Fatty acid oxidation	Mm.410189	NM_001009935 .2	TXNIP	Thioredoxin interacting protein		0,078937
	Mm.45423	NM_028037.4	ACAD10	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10	0,004925	
	Mm.20396	NM_007760.3	CRAT	Carnitine acetyltransferase	1,383706	
	Mm.119	NM_010444.2	NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	0,003643	
	Mm.250901	NM_007822.2	Cyp4a14	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14		0,003739
Lipid export	Mm.741	NM_010634.3	FABP5	Fatty acid binding protein 5, epidermal		3,82E-05
	Mm.4533	NM_007468.2	ApoA4	Apolipoprotein A-IV		0,006342
	Mm.2161	NM_018816.1	Apom	Apolipoprotein M		0,008448
	Mm.3644	NM_021272.3	FABP7	Fatty acid binding protein 7, brain		0,051552
	Mm.26743	NM_009692.3	ApoA1	Apolipoprotein A-I		0,004236
	Mm.40537	NM_001033336 .3	Abcc4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	0,009320	
	Mm.243758	NM_173786.1	Apol9a	Apolipoprotein L 9a	0,015458	
	Mm.232636	NM_029419.2	Apol7a	Apolipoprotein L 7a	0,000432	

Supplementary table 2. List of genes up and down-regulated from lipid synthesis pathway in the SHBG- SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
				upreg	downreg
Mm.40537	NM_001163676	ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C, member 4	0,00937971	
Mm.31374	NM_133360.2	ACACA	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha		0,0035307
Mm.81793	NM_133904.2	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta		0,0788508
Mm.282039	NM_0011992 96.1	ACLY	ATP citrate lyase		0,0087123
Mm.255026	NM_019811.3	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2		0,0111673
Mm.248360	NM_010730.2	ANXA1	Annexin A1		0,0204937
Mm.26743	NM_009692.4	APOA1	Apolipoprotein A-I		0,0042586
Mm.250901	NM_007822.2	CYP4A14	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14	0,0015458	
Mm.316000	NM_007825.4	CYP7B1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1		0,0010228
Mm.249342	NM_007856.2	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase		0,0102949
Mm.8534	NM_207655.2	EGFR	Epidermal growth factor receptor		0,0037974
Mm.2567	NM_019423.2	ELOVL2	Elongation of very long chain fatty acids-2		0,0035307
Mm.741	NM_010634.3	FABP5	Fatty acid binding protein 5		3,82E-05
Mm.236443	NM_007988.3	FASN	Fatty acid synthase		0,0132154
Mm.210196	NM_008149.3	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial		0,0001482
Mm.316652	NM_008255.2	HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase		0,0011674
Mm.1514	NM_008509.2	LPL	Lipoprotein lipase		0,0394932
Mm.119	NM_010444.2	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	0,0036436	
Mm.4146	NM_0011462 68.1	PDGFRB	Platelet derived growth factor receptor, beta polipeptide		0,0015458
Mm.235547	NM_013743.2	PKD4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4		0,0416957
Mm.155620	NM_016915.4	PLA2G6	Phospholipase A2, group VI		0,0057545
Mm.3020	NM_0011273 30.1	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma		0,0005380
Mm.10516	NM_011169.5	PRLR	Prolactine receptor	0,01561341	
Mm.279741	NM_011254.5	RBP1	Retinol binding protein 1		0,0073801
Mm.193096	NM_009128.2	SCD-2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2		0,0103345
Mm.248380	NM_011577.1	TGFB1	transforming growth factor, beta 1		0,0174694
Mm.28585	NM_009381.2	THRSP	Thyroid hormone responsive		0,0054636
Mm.268000	NM_011701.4	VIM	vimentin		0,0048289
Mm.469937	NM_013842.3	XPB1	X-box binding protein 1		0,0029483

Supplementary table 3. List of genes up and down-regulated from lipid concentration pathway in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
				upreg	downreg
Mm.31374	NM_133360.2	ACACA	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha		0,00353078
Mm.81793	NM_133904.2	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta		0,07885081
Mm.371675	NM_134188.3	ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2		0,01171002
Mm.26743	NM_009692.4	APOA1	Apolipoprotein A-I		0,0042586
Mm.4533	NM_007468.2	APOA4	Apolipoprotein A-IV		0,00634299
Mm.273175	NM_007474.2	AQP8	Aquaporin 8		0,00397314
Mm.28278	NM_007616.4	CAV1	Caveolin 1		0,00185921
Mm.181074	NM_026439.2	CCDC80	coiled-coil domain containing 80		0,02111435
Mm.10026	NM_178373.3	CIDEC	Cell death-inducing DFFA-like effector c		5,25E-05
Mm.30211	NM_019568.2	CXCL14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14		0,04284979
Mm.42230	NM_007811.2	CYP26A1	Cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1	0,00448064	
Mm.249342	NM_007856.2	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase		0,01029493
Mm.2567	NM_019423.2	ELOVL2	Elongation of very long chain fatty acids-2		0,00353078
Mm.741	NM_010634.3	FABP5	Fatty acid binding protein 5		3,82E-05
Mm.236443	NM_007988.3	FASN	Fatty acid synthase		0,01321544
Mm.220358	NM_010292.5	GCK	glucokinase		0,00287278
Mm.210196	NM_008149.3	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial		0,00014826
Mm.896	NM_008362.2	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I		0,01045516
Mm.1100	NM_010564.4	INHA	Inhibin alpha	0,04387423	
Mm.275071	NM_010591.2	JUN	Jun oncogene		0,04575195
Mm.153625	NM_172950.3	LPIN1	Lipin 1		0,00096061
Mm.1514	NM_008509.2	LPL	Lipoprotein lipase		0,03949321
Mm.486506	NM_009803.5	NR1I3	Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	0,00318288	
Mm.130054	NM_001025074.2	NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	0,00139491	
Mm.3000	NM_008773.4	P2RY2	Purinergic receptor P2Y		0,00873713
Mm.491856	NM_011044.2	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	0,02737324	
Mm.133268	NM_153565.2	PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9		0,00498291
Mm.235547	NM_013743.2	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4		0,04169575
Mm.155620	NM_016915.4	PLA2G6	Phospholipase A2, group VI		0,00575457
Mm.6105	NM_011125.2	PLTP	Phospholipid transfer protein		0,00011957
Mm.3020	NM_001127330.1	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma		0,00053809
Mm.48638	NM_178143.2	PRKAA2	Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit		0,00640066
Mm.10516	NM_011169.5	PRLR	Prolactine receptor	0,01561341	
Mm.279741	NM_011254.5	RBP1	Retinol binding protein 1		0,00738018
Mm.193096	NM_009128.2	SCD-2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2		0,01033458
Mm.46062	NM_023134.4	SFTPA1	Surfactant associated protein A1	0,01032833	
Mm.248380	NM_011577.1	TGFB1	transforming growth factor, beta 1		0,01746943
Mm.172346	NM_009371.3	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II		0,00497313
Mm.28585	NM_009381.2	THRSP	Thyroid hormone responsive		0,00546364
Mm.116894	NM_016928.2	TLR5	Toll-like receptor 5		0,02703556
Mm.22216	NM_001077364.1	TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	0,0300513	
Mm.4141	NM_013703.2	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	0,0042586	
Mm.11223	NM_011723.3	XDH	Xanthine dehydrogenase	0,00047739	

Supplementary table 4. List of genes up and down-regulated from lipid homeostasis pathway in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
				upreg	downre
Mm.31374	NM_133360.2	ACACA	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha		0,003530 78
Mm.81793	NM_133904.2	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta		0,078850 81
Mm.4533	NM_007468.2	APOA4	Apolipoprotein A-IV		0,006342 99
Mm.28278	NM_007616.4	CAV1	Caveolin 1		0,001859 21
Mm.250901	NM_007822.2	CYP4A14	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14	0,0015458	
Mm.316000	NM_007825.4	CYP7B1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1		0,001022 87
-	NM_009846.2	CD24A	CD24a antigen		0,003802 63
Mm.249342	NM_007856.2	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase		0,010294 93
Mm.210196	NM_008149.3	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial		0,000148 26
Mm.1514	NM_008509.2	LPL	Lipoprotein lipase		0,039493 21
Mm.192991	NM_013602.3	Mt1	metallothionein 1	0,00725825	
Mm.147226	NM_008630.2	Mt2	metallothionein 2	0,01201542	
Mm.133268	NM_153565.2	PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9		0,004982 91
Mm.3020	NM_001127330.1	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma		0,000538 09
Mm.148800	NM_009117.3	SAA1	Serum amyloid A1		0,039879 73
Mm.193096	NM_009128.2	SCD-2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2		0,010334 58
Mm.28585	NM_009381.2	THRSP	Thyroid hormone responsive		0,005463 64
Mm.11223	NM_011723.3	XDH	Xanthine dehydrogenase	0,00047739	

Supplementary table 5. List of genes up and down-regulated from fatty acid synthesis pathway in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
				upreg	downreg
Mm.81793	NM_133904.2	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta		0,07885081
Mm.255026	NM_019811.3	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2		0,01116737
Mm.248360	NM_010730.2	ANXA1	Annexin A1		0,02049373
Mm.250901	NM_007822.2	CYP4A14	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14	0,0015458	
Mm.2567	NM_019423.2	ELOVL2	Elongation of very long chain fatty acids-2		0,00353078
Mm.235547	NM_013743.2	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4		0,04169575
Mm.155620	NM_016915.4	PLA2G6	Phospholypase A2, group VI		0,00575457
Mm.193096	NM_009128.2	SCD-2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2		0,01033458
Mm.248380	NM_011577.1	TGFB1	transforming growth factor, beta 1		0,01746943

Supplementary table 6. List of genes up and down-regulated from fatty acid concentration pathway in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
				upreg	downreg
Mm.81793	NM_133904.2	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta		0,07885081
Mm.371675	NM_134188.3	ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2		0,01171002
Mm.28278	NM_007616.4	CAV1	Caveolin 1		0,00185921
Mm.181074	NM_026439.2	CCDC80	coiled-coil domain containing 80		0,02111435
Mm.10026	NM_178373.3	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector c		
Mm.2567	NM_019423.2	ELOVL2	Elongation of very long chain fatty acids-2		0,00353078
Mm.220358	NM_010292.5	GCK	glucokinase		0,00287278
Mm.210196	NM_008149.3	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial		0,00014826
Mm.153625	NM_172950.3	LPIN1	Lipin 1		0,00096061
Mm.491856	NM_011044.2	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	0,02737324	
Mm.235547	NM_013743.2	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4		0,04169575
Mm.3020	NM_001127330.1	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma		0,00053809
Mm.48638	NM_178143.2	PRKAA2	Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit		0,00640066
Mm.193096	NM_009128.2	SCD-2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2		0,01033458
Mm.172346	NM_009371.3	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II		0,00497313
Mm.4141	NM_013703.2	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	0,0042586	

Supplementary table 7. List of genes up and down-regulated from fatty acid metabolism pathway in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
				upreg	downreg
Mm.81793	NM_133904. 2	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta		0,07885081
Mm.371675	NM_134188. 3	ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2		0,01171002
Mm.35071	NM_145368. 2	ACNAT2	acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 2		
Mm.255026	NM_019811. 3	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2		0,01116737
Mm.248360	NM_010730. 2	ANXA1	Annexin A1		0,02049373
Mm.26743	NM_009692. 4	APOA1	Apolipoprotein A-I		0,0042586
Mm.28278	NM_007616. 4	CAV1	Caveolin 1		0,00185921
Mm.250901	NM_007822. 2	CYP4A14	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14	0,0015458	
Mm.2567	NM_019423. 2	ELOVL2	Elongation of very long chain fatty acids-2		0,00353078
Mm.210196	NM_008149. 3	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial		0,00014826
Mm.153625	NM_172950. 3	LPIN1	Lipin 1		0,00096061
Mm.235547	NM_013743. 2	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4		0,04169575
Mm.155620	NM_016915. 4	PLA2G6	Phospholypase A2, group VI		0,00575457
Mm.3020	NM_0011273 30.1	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma		0,00053809
Mm.148800	NM_009117. 3	SAA1	Serum amyloid A1		0,03987973
Mm.193096	NM_009128. 2	SCD-2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2		0,01033458
Mm.248380	NM_011577. 1	TGFB1	transforming growth factor, beta 1		0,01746943
Mm.290527	NM_031176. 2	TNXB	Tenascin XB		0,00864943

Supplementary table 8. List of genes up and down-regulated from synthesis of TG pathway in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
				upreg	downr
Mm.210196	NM_008149.3	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial		0,00014826
Mm.3020	NM_001127330.1	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma		0,00053809
Mm.193096	NM_009128.2	SCD-2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2		0,01033458
Mm.28585	NM_009381.2	THRSP	Thyroid hormone responsive		0,00546364

Supplementary table 9. List of genes up and down-regulated from TG concentration pathway in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg-db/db	
				upreg	downreg
Mm.81793	NM_133904.2	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta		0,07885081
Mm.26743	NM_009692.4	APOA1	Apolipoprotein A-I		0,0042586
Mm.4533	NM_007468.2	APOA4	Apolipoprotein A-IV		0,00634299
Mm.273175	NM_007474.2	AQP8	Aquaporin 8		0,00397314
Mm.28278	NM_007616.4	CAV1	Caveolin 1		0,00185921
Mm.10026	NM_178373.3	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector c		5,25E-05
Mm.741	NM_010634.3	FABP5	Fatty acid binding protein 5		3,82E-05
Mm.220358	NM_010292.5	GCK	glucokinase		0,00287278
Mm.210196	NM_008149.3	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial		0,00014826
Mm.275071	NM_010591.2	JUN	Jun oncogene		0,04575195
Mm.153625	NM_172950.3	LPIN1	Lipin 1		0,00096061
Mm.1514	NM_008509.2	LPL	Lipoprotein lipase		0,03949321
Mm.491856	NM_011044.2	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	0,0273732	
Mm.193096	NM_009128.2	SCD-2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2		0,01033458
Mm.28585	NM_009381.2	THRSP	Thyroid hormone responsive		0,00546364
Mm.116894	NM_016928.2	TLR5	Toll-like receptor 5		0,02703556
Mm.4141	NM_013703.2	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	0,0042586	
Mm.11223	NM_011723.3	XDH	Xanthine dehydrogenase	0,00047739	

Supplementary Table 10. Microarray results of the main transcription factors regulating hepatic lipogenesis in the SHBG-C57BL/ksJ-db/db mice when compared with the C57BL/ksJ-db/db mice.

Unigene	RefSeq	Symbol	Description	P-value db/db vs shbg- db/db	
				upreg	downr
Mm.3020	NM_001127330.1	PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	-	0,00053809
Mm.278701	NM_011480.3	SREBP1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	-	ns
Mm.22690	NM_013839.4	LXR	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	-	ns

Supplementary Table 11. Oligonucleotide primer pairs used in real-time PCR experiments.

Real-time PCR	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
h SHBG	GCTGATTATGGAGAGCAGAGG	GGTCATGACAGCGATAGGCT
h ACC	GACTGGGTAGAGCGATTGATG	CCTTCTTGATAGACTTCTCCAC
h ACLY	TGTAACAGAGCCAGGAACCC	CTGTACCCCAGTGGCTGTTT
h FAS	CCCAAGCAGGCACACACG	GGCCTCCGAGGTCTCAG
h PPARG	TGAAGCTGAACCACCCTGAGT	GACCGTGTTCCGTGACAATC
h18S	TAACGAACGAGACTCTGGCAT	CGGACATCTAAGGGCATCACAG
m ACC	GCCATTGGTATTGGGGCTTAC	CCCGACCAAGGACTTTGTTG
m ACLY	GAATGCTGGACAACATCCTG	G TTCATTAGACATGCCTCCTG
m FAS	GGCATCATTGGGCACTCCTT	GCTGCAAGCACAGCCTCTCT
m PPARG	TCTTAACTGCCGGATCCACAA	GCCCAAACCTGATGGCATT
m 18S	AGGGTTCGATTCCGGAGAGG	CAACTTTAATATACGCTATTGG

