

JOSÉ AUGUSTO CIPRIANO GUEDES

**A osteocalcina melhora a resistência à insulina e a inflamação em camundongos
obesos: participação do fígado, tecido adiposo branco e osso.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Dra. Daniela Tomie Furuya

Versão parcial

São Paulo
2018

RESUMO

GUEDES, J. A. C.. **A osteocalcina melhora a resistência à insulina e a inflamação em camundongos obesos: participação do fígado, tecido adiposo branco e osso.** 2018. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Fisiologia Humana)) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A descoberta da osteocalcina, uma proteína sintetizada por osteoblastos, como hormônio com efeitos positivos na resistência à insulina contribuiu para conceituar o osso como órgão endócrino. Pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares de atuação da osteocalcina sobre o quadro de melhora de resistência à insulina, sendo assim o presente projeto teve o objetivo de desvendar alguns mecanismos moleculares da ação de osteocalcina na resistência à insulina e inflamação em camundongos obesos, e em adipócitos 3T3-L1. Camundongos controles, obesos tratados com solução salina e obesos tratados com osteocalcina não carboxilada, foram submetidos aos testes de tolerância à insulina, ao piruvato e ao ensaio de sinalização da insulina *in vivo*, à coleta de sangue (análises bioquímicas e metabólicas), de tecido adiposo branco (TAB), de fígado e de fêmur. Os efeitos da osteocalcina não carboxilada na resistência à insulina e inflamação foram avaliados em adipócitos da linhagem 3T3-L1 desafiados com TNF- α . O conteúdo de mRNA foi analisado por PCR quantitativo e de proteína, por *Western blotting*. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com osteocalcina não carboxilada melhora a sensibilidade à insulina *in vivo* em camundongos obesos. No tecido adiposo branco (TAB), a osteocalcina teve efeitos positivos como a redução na massa do TAB periepídimo, o aumento a expressão do gene *Slc2a4* e o conteúdo proteico de GLUT4, melhora na fosforilação de AKT estimulada pela sinalização da insulina, além de reduzir a expressão de genes relacionados à inflamação e à maquinaria transcricional do inflamassomo e reduzir focos inflamatórios caracterizados pela ausência de coroas de macrófagos. Em adipócitos 3T3-L1 desafiados com TNF- α , a osteocalcina recuperou o conteúdo de *Slc2a4*/GLUT4 e reduziu a expressão de genes inflamatórios, além de que o tratamento com osteocalcina aumentou a fosforilação de AKT induzida pela insulina. No fígado, a osteocalcina aumentou a sensibilidade à insulina e aumentou a fosforilação de AKT induzida pela insulina *in vivo* e reduziu a expressão de mRNA de *Tnfa*, sem alterar a expressão da proteína GLUT2 e de seu respectivo gene. No osso, a osteocalcina melhorou a resistência à insulina por favorecer a fosforilação de AKT induzida pela sinalização da insulina e por reduzir a expressão de genes envolvidos na resistência à insulina, resultando no aumento da secreção de osteocalcina não carboxilada na circulação. Em conclusão, conseguiu-se demonstrar alguns mecanismos de ação da osteocalcina na melhora do quadro de resistência à insulina na obesidade, em que no TAB a osteocalcina melhora a resistência à insulina por diminuir a inflamação e aumentar a sinalização da insulina e a expressão de *Slc2a4*/GLUT4; no fígado, a osteocalcina melhorou a sinalização insulínica e reduziu a expressão de *Tnfa*; e no osso a osteocalcina aumentou a secreção de osteocalcina não carboxilada por melhorar a resistência à insulina.

Palavras-chave: Osteocalcina. Resistência à insulina. Inflamação. Obesidade. GLUT4.

ABSTRACT

GUEDES ,J. A. C.. **Osteocalcin improves insulin resistance and inflammation in obese mice: Participation of liver, white adipose tissue and bone.** 2018. 89 1. Dissertation (Master of Science (Human Physiology)) –Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

The discovery of osteocalcin, a protein synthesized by osteoblasts, as a hormone that has positive effects on insulin resistance, contributed to support the concept of bone as an endocrine organ. However, very little is known about the molecular pathways involved in osteocalcin improved-insulin resistance. The present study aimed to investigate the mechanisms of action of osteocalcin on insulin resistance and inflammation in obese mice and 3T3-L1 adipocytes. Lean control, saline-treated obese and uncarboxylated osteocalcin (uOC)-treated obese mice were subjected to insulin and pyruvate tolerance test and insulin signaling assessment *in vivo*. Blood was collected for biochemical/metabolic profile analysis; and, liver, skeletal muscle, white adipose tissue(WAT) and bone were collected for protein (*Western blotting*) and mRNA (RT-qPCR) analysis. uOC effects on insulin resistance and inflammation were also investigated in 3T3-L1 adipocytes challenged with tumor necrosis factor. Osteocalcin treatment improved *in vivo* insulin resistance in obese mice. In WAT, osteocalcin had positive effects such as WAT weight reduction; upregulation of glucose transporter (GLUT4) protein and its mRNA (*Slc2a4*); improved insulin-induced AKT phosphorylation; downregulation of several genes involved in inflammation and inflammasome transcriptional machinery, and reduction of the density of macrophage in crown-like structures (histomorphometrical analysis). Notably, in 3T3-L1 adipocytes, osteocalcin restored *Slc2a4*/GLUT4 content and reduced the expression of inflammatory genes after TNF- α challenge; moreover, osteocalcin treatment increased AKT phosphorylation induced by insulin. In liver, osteocalcin treatment improved insulin resistance and increased AKT phosphorylation induced by insulin, and reduced the expression of *Tnfa*, not changing the expression of glucose transporter (GLUT2) protein and its mRNA (*Slc2a2*). Finally, it was observed that in bone, osteocalcin improves insulin resistance by increasing insulin-induced AKT phosphorylation and reducing the expression of genes involved in bone insulin resistance, resulting in increased secretion of uncarboxylated osteocalcin in circulation. We provided some mechanisms of action for osteocalcin in the amelioration of insulin resistance in obesity: in WAT, osteocalcin improves insulin resistance by decreasing inflammation, and increasing insulin signaling and the expression of *Slc2a4*/GLUT4; in liver, the osteocalcin improved insulin resistance and reduced *Tnfa* expression; and, in bone, osteocalcin increases the secretion of uncarboxylated osteocalcin by improving insulin resistance.

Keywords: Osteocalcin. Insulin resistance. Inflammation. Obesity. GLUT4.

1 INTRODUÇÃO

Diversas descobertas nos últimos anos contribuíram para mudar o conceito clássico de que o osso é apenas uma importante estrutura de suporte, proteção ou de depósito de íons de cálcio e fosfato, bem como um alvo da ação de diversos hormônios. A descoberta de que o hormônio derivado do adipócito, a leptina age via sistema nervoso central em osteoblastos inibindo a formação óssea (DUCY et al., 2000), somada ao conhecimento de que a regulação endócrina baseia-se em um mecanismo de retroalimentação, resultou na relevante descoberta de que o esqueleto possui função endócrina, cujos osteoblastos secretam uma proteína, a osteocalcina que exerce grande influência sobre a secreção de insulina e a sensibilidade a esse hormônio, o metabolismo de gordura (LEE et al., 2007), além de funções relacionadas à reprodução e à cognição (OURY et al., 2013; KARSENTY; OURY, 2014).

1.1 A formação de osteocalcina

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado que é constituído pela matriz extracelular calcificada e por componentes celulares. A matriz extracelular é composta por uma parte inorgânica e outra orgânica. Os componentes inorgânicos representam cerca de 50% do peso da matriz óssea, sendo cálcio e fosfato os principais íons da parte inorgânica, os quais formam os cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Os componentes orgânicos são constituídos por proteínas, mucopolissacarídeos ácidos e lipídeos (JUNQUEIRA, 2013).

Existem três principais componentes celulares no tecido ósseo: 1) os osteoblastos, células mesenquimais que sintetizam a parte orgânica da matriz extracelular e concentram fosfato de cálcio essenciais para mineralização da matriz óssea; 2) os osteócitos, originados a partir de osteoblastos quando estes são envolvidos pela matriz óssea recém sintetizada, são células fundamentais para a manutenção da matriz óssea; e, 3) os osteoclastos, células móveis, gigantes, multinucleadas, extremamente ramificadas que atuam na dissolução de minerais e digestão da parte inorgânica, permitindo assim a reabsorção óssea (JUNQUEIRA, 2013).

Entre as proteínas não colágenas presentes na composição da matriz extracelular óssea, a osteocalcina é a mais abundante, porém a sua função neste contexto ainda é pouco conhecida. Alguns estudos indicam que a osteocalcina pode ter papel relacionado à regulação da mineralização, maturação e remodelagem do tecido ósseo (IWAMOTO et

al., 2004; PEARSON, 2007). A osteocalcina, também denominada proteína ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) óssea, é sintetizada principalmente por osteoblastos e tem em média de 46 a 50 aminoácidos e cerca de 5,6 kDa de peso molecular (HAUSCHKA et al., 1989). Em seres humanos, o gene para a osteocalcina, *Bglap*, localizado no cromossomo 1 (1q25-1q31) (PUCHACZ et al., 1989), codifica uma pré-pró-proteína de 98 aminoácidos com 11 kDa, que dá origem à proteína madura após uma sucessão de clivagens. As modificações pós-traducionais se iniciam pela remoção do peptídeo sinal e do pró-peptídeo, após ocorre um processo em que três resíduos glutâmicos (nas posições 17, 21 e 24, em seres humanos) são transformados em três resíduos GLA, por um processo de γ -carboxilação dependente de vitamina K, e realizado pela enzima γ -glutamylcarboxilase, que é codificada pelo gene *Ggcx* (MORRIS et al., 1995). Após a modificação pós-traducional, a osteocalcina é empacotada em vesículas intracelulares, e posteriormente secretada na matriz óssea e liberada na circulação (HAUSCHKA et al., 1989; GUNDBERG; CLOUGH, 1992). Os resíduos GLA da osteocalcina são muito importantes para que os íons de Ca^{2+} sejam atraídos e incorporados aos cristais de hidroxiapatita na matriz extracelular (BERKNER, 2005).

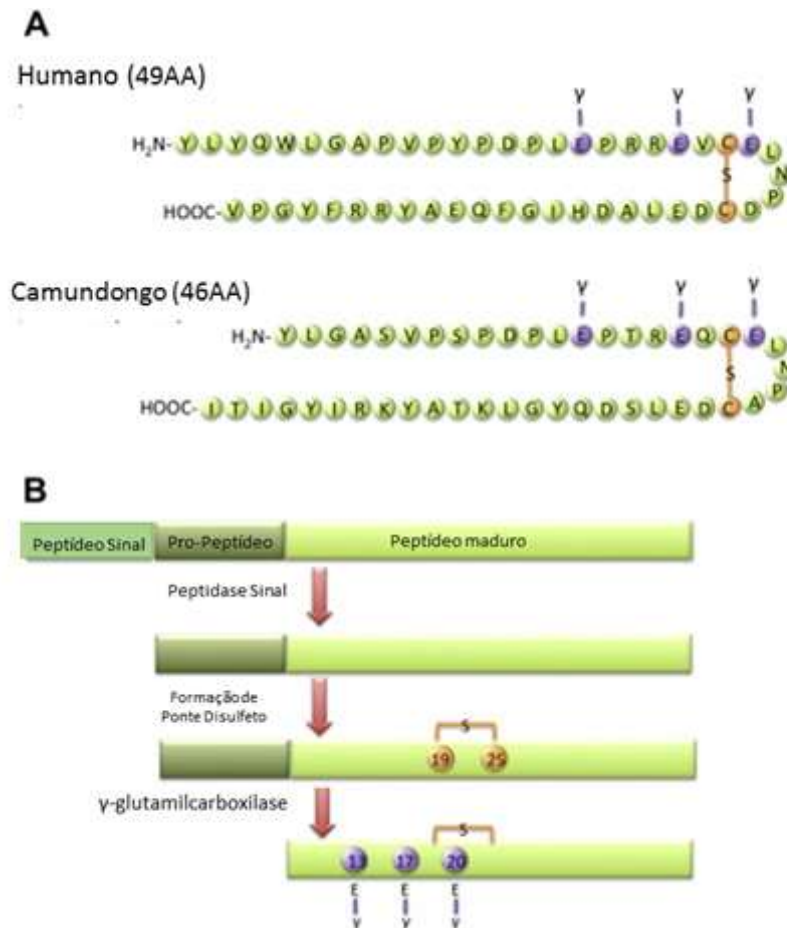


Figura 1- Estrutura e modificações pós traducionais da osteocalcina. (A) Representação esquemática da estrutura peptídica da osteocalcina humana e de camundongo. (B) Esquema das modificações pós-traducionais da osteocalcina. (adaptado de (ZOCH; CLEMENS; RIDDLE, 2015)).

1.2 Regulação do metabolismo de glicose pela osteocalcina

As ações da osteocalcina na homeostase de glicose estão associadas à forma não carboxilada da osteocalcina, como primeiramente demonstrado em animais *knockout* para o gene *Esp* (*Esp*^{-/-}) em osteoblastos (LEE et al., 2007). O gene *Esp*, ou *Ptprv*, foi identificado por Lee e colegas como um gene derivado de osteoblastos que estaria envolvido na regulação do nível de osteocalcina circulante. Este gene é expresso por osteoblastos e células de Sertoli (MAURO et al., 1994), codifica a proteína tirosina fosfatase osteotesticular (OST-PTP), que parece ter papel fundamental na regulação do grau de carboxilação de osteocalcina (LEE et al., 2007), agindo assim como uma proteína reguladora do metabolismo da glicose em camundongos. Camundongos *Esp*^{-/-} apresentam várias diferenças em relação a camundongos selvagens, tais como: hipoglicemia; aumento da proliferação de células B pancreáticas; maior tolerância à glicose e maior

sensibilidade à insulina, atribuídos à maior captação de glicose pelo músculo, tecido adiposo branco e marrom, e menor liberação de glicose pelo fígado e maior expressão de adiponectina; e, proteção contra resistência à insulina e à obesidade induzida por lesão hipotalâmica ou por dieta hiperlipídica. Por outro lado, camundongos *Bglap*^{-/-} apresentam características opostas aos camundongos *Esp*^{-/-} (LEE et al., 2007).

Estudos sugeriram que a perda de função da OST-PTP em camundongos *Esp*^{-/-} aumenta a ativação dos osteoclastos (FERRON et al., 2010). Em consequência da maior ativação de osteoclastos, o pH baixo na lacuna de reabsorção, resultaria na descarboxilação da osteocalcina presente na matriz óssea. A osteocalcina na forma descarboxilada tem menor afinidade pela matriz óssea, sendo mais facilmente liberada na circulação (FERRON et al., 2010). Ademais, estudos sugerem que a insulina regula a produção de osteocalcina bem como favorece a descarboxilação da mesma (FERRON et al., 2010; FULZELE et al., 2010). Assim, a sinalização da insulina em osteoblastos permitiria maior diferenciação de osteoclastos, possibilitando maior reabsorção óssea e uma acidificação local, que é essencial para a descarboxilação da osteocalcina extracelular.

É sugerido que as ações de osteocalcina ocorrem por meio de um receptor recém-descoberto pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G, GPRC6A (PI et al., 2005). Camundongos *Gprc6*^{-/-} apresentam intolerância à glicose, diminuída secreção à insulina e feminização (PI et al., 2008). Embora a expressão do mRNA desse receptor tenha sido encontrada em diversos órgãos, como pulmão, coração, rins, testículos, cérebro, pâncreas, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (KUANG et al., 2005; PI et al., 2005), a ação efetiva da osteocalcina por meio de GPRC6A é conhecida somente em poucos tipos celulares, tais como células de Leydig, onde estimula a produção de testosterona (OURY et al., 2011), e células B pancreáticas, onde estimula a atividade de ERK e secreção de insulina (PI; WU; QUARLES, 2011).

As bases moleculares da ação da osteocalcina não carboxilada sobre o metabolismo de glicose é um vasto campo a ser explorado, já que somente poucos estudos são encontrados na literatura. Nesse sentido, os principais dados que se tem são que a osteocalcina não carboxilada age na célula B pancreática, aumentando a expressão do gene da insulina e de genes necessários para a proliferação das células B; em adipócito branco, aumentando a expressão de adiponectina, e de genes alvos da mesma; em adipócito marrom, aumentando genes relacionados ao gasto energético; em adipócitos, células musculares esqueléticas e hepatócitos, reduzindo o estresse oxidativo e

restaurando a resistência à insulina por meio da via PI3-cinase/AKT/NFKB (FERRON et al., 2008; ZHOU et al., 2013).

1.3 Evidências clínicas e terapêuticas de ação da osteocalcina

Em consistência com os estudos em animais, estudos em humanos verificaram que o nível de osteocalcina está reduzido em pacientes com diabetes do tipo II (DM2), e que osteocalcina se correlaciona inversamente com resistência à insulina e adiposidade (KINDBLOM et al., 2009; FORESTA et al., 2010; KIM et al., 2010; YEAP et al., 2010; ALFADDA et al., 2013), porém, nestes estudos não foi avaliado o nível sérico de osteocalcina não carboxilada, mas somente o de osteocalcina. Poucos estudos analisaram especificamente os níveis de osteocalcina não carboxilada na circulação (KANAZAWA et al., 2011; LIU et al., 2015; YEAP et al., 2015), adicionalmente, uma meta-análise de 39 estudos envolvendo 23381 participantes indica que tanto a osteocalcina total quanto a osteocalcina não carboxilada se relacionam negativamente com a glicose plasmática do período de jejum e com a hemoglobina glicada A1c (LIU et al., 2015).

Na tentativa de determinar a relevância terapêutica de osteocalcina não carboxilada, alguns estudos verificaram que animais sob dieta hiperlipídica tratados com esta proteína apresentaram aumento de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina, aumento da secreção de insulina, redução do tecido adiposo e prevenção contra esteatose hepática (FERRON et al., 2008, 2012; ZHOU et al., 2013).

1.4 Obesidade, resistência à insulina e inflamação

A obesidade se caracteriza por ser uma síndrome complexa de etiologia multifatorial, mas que pode ser atribuída, de forma simplificada, a um desequilíbrio dos sistemas reguladores do peso corpóreo, o qual gera acúmulo de gordura corporal. Esta síndrome tem alcançado proporções epidêmicas ao redor do mundo, e está associada com grande frequência a dislipidemia, DM2, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, doenças ortopédicas, e alguns tipos de câncer (DO PRADO et al., 2009).

A obesidade está relacionada a um estado de inflamação subclínico, uma vez que muitas citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda associadas à inflamação, como a proteína C-reativa, se encontram em nível elevado em pacientes obesos.

Os marcadores inflamatórios na obesidade podem ter duas principais origens: 1) fígado e células do sistema imune; 2) tecido adiposo branco. Neste contexto, os adipócitos são a fonte de diversas citocinas pró-inflamatórias, além de secretarem fatores que estimulam a produção de outros fatores inflamatórios pelo fígado e por outros órgãos (DO PRADO et al., 2009). Desta maneira, os tecidos adiposo e hepático têm papel fundamental no contexto inflamatório da obesidade.

A via do fator nuclear kappa B (NFkB) é uma das principais vias inflamatórias do tecido adiposo, que se encontra ativada na obesidade por ação de componentes que estão elevados neste estado, como por exemplo, citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral, TNF- α , codificado pelo gene *Tnfa*; e, interleucinas 6 e 1B, IL-6, IL-1 beta, codificadas respectivamente pelos genes *Il6* e *Il1b*), espécies reativas de oxigênio, produtos de glicação avançada (AGEs) e lipídeos. A ativação dessa via resulta em recrutamento de macrófagos e manutenção do estado inflamatório (KRETZ-REMY, 1996; PERKINS, 2007; FURUYA et al., 2010). Adicionalmente, a ativação da via pode também conduzir à: 1) fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 em serina (GAO et al., 2002, 2003), resultando em inibição da sinalização da insulina por esse mecanismo; e, 2) repressão do gene *Slc2a4*, que codifica a proteína transportadora de glicose GLUT4, contribuindo para o aumento da resistência à insulina (FURUYA et al., 2013).

A obesidade e o DM2 apresentam uma forte correlação com o acúmulo de gordura nas células do fígado, quadro caracterizado como esteatose hepática ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (SILVERMAN et al., 1990; DIXON; BHATHAL; O'BRIEN, 2001; BUGIANESI et al., 2002; MARCHESINI et al., 2003). A inflamação tem papel fundamental na progressão da DHGNA, que pode progredir de uma simples esteatose a uma cirrose. Outrossim, animais obesos apresentam além de resistência à insulina, esteatose hepática e aumento da ativação da via de NFkB no fígado (CAI et al., 2005). Alguns fatores podem colaborar para o aumento do estado inflamatório hepático tais como: acúmulo de gordura e aumento da liberação de ácidos graxos e citocinas pró-inflamatórias na circulação portal, provenientes do tecido adiposo visceral (CAI et al., 2005; FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010; HEBBARD; GEORGE, 2011). Adicionalmente, hepatócitos submetidos à alta concentração de glicose apresentam aumentada ativação da via do NFkB (IWASAKI et al., 2007).

Foi sugerido que osteocalcina não carboxilada age sobre a via NFκB (ZHOU et al., 2013). No entanto, em contraposição ao mecanismo proposto de que a ativação de NFκB ocorre durante o estresse de retículo endoplasmático (RE) (TAM et al., 2012), Zhou e colaboradores (2013) observaram que a osteocalcina ativa a via NFκB em adipócitos, hepatócitos e células musculares esqueléticas resultando em redução do estresse de RE, e assim atenuando a resistência à insulina. Esses resultados *in vitro* parecem opor-se aos resultados *in vivo* obtidos nesse mesmo trabalho, que demonstrou que o tratamento com osteocalcina no tecido hepático reduz a expressão de TNF-α, cuja expressão é induzida pela ativação da via do NFκB. Ainda em oposição a esse último estudo, animais tratados com osteocalcina não carboxilada apresentam menor expressão de *Tnfa* no fígado (FERRON et al., 2012), e camundongos *Esp^{-/-}* apresentam significativa redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (LEE et al., 2007), indicando uma provável ação anti-inflamatória da osteocalcina não carboxilada, o que poderia ocorrer via NFκB.

2 CONCLUSÃO

A osteocalcina não carboxilada teve grande atuação sobre o metabolismo de glicose em modelo de camundongos obesos por lesão hipotalâmica, uma vez que foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina *in vivo*, com importante participação do fígado, tecido adiposo e osso.

No fígado, a osteocalcina melhorou a resistência à insulina, o que foi observado pelo aumento do conteúdo de AKT fosforilada e redução da ativação da via gliconeogênica. Além disso, a osteocalcina melhorou a inflamação, reduzindo a expressão de *Tnfa*; porém, esse hormônio não mostrou efeito sobre a esteatose hepática.

No TAB e em adipócitos 3T3-L1, a osteocalcina melhorou a resistência à insulina, o que foi observada pelo aumento do conteúdo de mRNA de *Slc2a4* e de proteína GLUT4, bem como o conteúdo de AKT fosforilada. Adicionalmente, a osteocalcina reduziu a inflamação no TAB.

No osso, a osteocalcina melhorou a sinalização da insulina, observada pelo aumento do conteúdo de AKT fosforilada, bem como pelo aumento da expressão dos genes *Opg* e *Ptprv*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFADDA, A. A.; MASOOD, A.; SHAIK, S. A.; DEKHIL, H.; GORAN, M. Association between osteocalcin, metabolic syndrome, and cardiovascular risk factors: Role of total and undercarboxylated osteocalcin in patients with type 2 diabetes. **International Journal of Endocrinology**, 2013.

BERKNER, K. L. THE VITAMIN K-DEPENDENT CARBOXYLASE. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 127-149, 21 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092713>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

BUGIANESI, E.; LEONE, N.; VANNI, E.; MARCHESINI, G.; BRUNELLO, F.; CARUCCI, P.; MUSSO, A.; DE PAOLIS, P.; CAPUSSOTTI, L.; SALIZZONI, M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, 2002.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D. F.; MELENDEZ, P. A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. **Nature Medicine**, 2005.

DIXON, J. B.; BHATHAL, P. S.; O'BRIEN, P. E. Nonalcoholic fatty liver disease: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. **Gastroenterology**, 2001.

DO PRADO, W. L.; LOFRANO, M. C.; OYAMA, L. M.; DÂMASO, A. R. Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2009.

DUCY, P.; AMLING, M.; TAKEDA, S.; PRIEMEL, M.; SCHILLING, a F.; BEIL, F. T.; SHEN, J.; VINSON, C.; RUEGER, J. M.; KARSENTY, G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. **Cell**, 2000.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. **Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications** **Hepatology**, 2010. .

FERRON, M.; HINOI, E.; KARSENTY, G.; DUCY, P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2008.

FERRON, M.; MCKEE, M. D.; LEVINE, R. L.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. **Bone**, 2012.

FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIZAWA, T.; DEL FATTORE, A.; DEPINHO, R. A.; TETI, A.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. **Cell**, 2010.

FORESTA, C.; STRAPAZZON, G.; DE TONI, L.; GIANESELLO, L.; CALCAGNO, A.; PILON, C.; PLEBANI, M.; VETTOR, R. Evidence for osteocalcin production by adipose tissue and its role in human metabolism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2010.

FULZELE, K.; RIDDLE, R. C.; DIGIROLAMO, D. J.; CAO, X.; WAN, C.; CHEN, D.; FAUGERE, M. C.; AJA, S.; HUSSAIN, M. A.; BRÜNING, J. C.; CLEMENS, T. L. Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. **Cell**, 2010.

FURUYA, D. T.; NERI, E. A.; POLETTI, A. C.; ANHÊ, G. F.; FREITAS, H. S.; CAMPELLO, R. S.; REBOUÇAS, N. A.; MACHADO, U. F. Identification of nuclear factor- κ B sites in the Slc2a4 gene promoter. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2013.

FURUYA, D. T.; POLETTI, A. C.; FAVARO, R. R.; MARTINS, J. O.; ZORN, T. M. T.; MACHADO, U. F. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 2010.

GAO, Z.; HWANG, D.; BATAILLE, F.; LEFEVRE, M.; YORK, D.; QUON, M. J.; YE, J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002.

GAO, Z.; ZUBERI, A.; QUON, M. J.; DONG, Z.; YE, J. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. **The Journal of biological chemistry**, 2003.

GUNDBERG, C. M.; CLOUGH, M. E. The osteocalcin propeptide is not secreted in vivo or in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, 1992.

HAUSCHKA, P. V.; LIAN, J. B.; COLE, D. E.; GUNDBERG, C. M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. **Physiological Reviews**, v. 69, n. 3, p. 990–1047, jul. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2664828>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

HEBBARD, L.; GEORGE, J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2011.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; ICHIMURA, S.; SATO, Y.; YEH, J. K. Differential effect of vitamin K and vitamin D supplementation on bone mass in young rats fed normal or low calcium diet. **Yonsei Medical Journal**, 2004.

IWASAKI, Y.; KAMBAYASHI, M.; ASAI, M.; YOSHIDA, M.; NIGAWARA, T.; HASHIMOTO, K. High glucose alone, as well as in combination with proinflammatory cytokines, stimulates nuclear factor kappa-B-mediated transcription in hepatocytes in vitro. **Journal of Diabetes and its Complications**, 2007.

KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; TADA, Y.; YAMAUCHI, M.; YANO, S.; SUGIMOTO, T. Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. **Bone**, 2011.

KARSENTY, G.; OURY, F. **Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014. .

KIM, S. H.; LEE, J. W.; IM, J. A.; HWANG, H. J. Serum osteocalcin is related to abdominal obesity in Korean obese and overweight men. **Clinica Chimica Acta**, 2010.

KINDBLOM, J. M.; OHLSSON, C.; LJUNGGREN, O.; KARLSSON, M. K.; TIVESTEN, Å.; SMITH, U.; MELLSTRÖM, D. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2009.

KRETZ-REMY, C. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. **The Journal of Cell Biology**, 1996.

KUANG, D.; YAO, Y.; LAM, J.; TSUSHIMA, R. G.; HAMPSON, D. R. Cloning and characterization of a Family C orphan G-protein coupled receptor. **Journal of Neurochemistry**, 2005.

LEE, N. K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J. D.; CONFAVREUX, C.; DACQUIN, R.; MEE, P. J.; MCKEE, M. D.; JUNG, D. Y.; ZHANG, Z.; KIM, J. K.; MAUVAIS-JARVIS, F.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. **Cell**, 2007.

LIU, D. M.; GUO, X. Z.; TONG, H. J.; TAO, B.; SUN, L. H.; ZHAO, H. Y.; NING, G.; LIU, J. M. Association between osteocalcin and glucose metabolism: a meta-analysis. **Osteoporosis International**, 2015.

MARCHESINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, G.; CERRELLI, F.; LENZI, M.; MANINI, R.; NATALE, S.; VANNI, E.; VILLANOVA, N.; MELCHIONDA, N.; RIZZETTO, M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, 2003.

MAURO, L. J.; OLMSTED, E. A.; SKROBACZ, B. M.; MOUREY, R. J.; DAVIS, A. R.; DIXON, J. E. Identification of a hormonally regulated protein tyrosine phosphatase associated with bone and testicular differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, 1994.

MORRIS, D. P.; STEVENS, R. D.; WRIGHT, D. J.; STAFFORD, D. W. Processive post-translational modification: Vitamin K-dependent carboxylation of a peptide substrate. **Journal of Biological Chemistry**, 1995.

OURY, F.; KHRIMIAN, L.; DENNY, C. A.; GARDIN, A.; CHAMOUNI, A.; GOEDEN, N.; HUANG, Y. Y.; LEE, H.; SRINIVAS, P.; GAO, X. B.; SUYAMA, S.; LANGER, T.; MANN, J. J.; HORVATH, T. L.; BONNIN, A.; KARSENTY, G. XMaternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. **Cell**, 2013.

OURY, F.; SUMARA, G.; SUMARA, O.; FERRON, M.; CHANG, H.; SMITH, C. E.; HERMO, L.; SUAREZ, S.; ROTH, B. L.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. **Cell**, 2011.

PEARSON, D. A. **Bone health and osteoporosis: The role of vitamin K and potential antagonism by anticoagulants** *Nutrition in Clinical Practice*, 2007. .

PERKINS, N. D. **Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007. .

PI, M.; CHEN, L.; HUANG, M. Z.; ZHU, W.; RINGHOFER, B.; LUO, J.; CHRISTENSON, L.; LI, B.; ZHANG, J.; JACKSON, P. D.; FABER, P.; BRUNDEN, K. R.; HARRINGTON, J. J.; QUARLES, L. D. GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. **PLoS ONE**, 2008.

PI, M.; FABER, P.; EKEMA, G.; JACKSON, P. D.; TING, A.; WANG, N.; FONTILLA-POOLE, M.; MAYS, R. W.; BRUNDEN, K. R.; HARRINGTON, J. J.; QUARLES, L. D. Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. **The Journal of biological chemistry**, 2005.

PI, M.; WU, Y.; QUARLES, L. D. GPRC6A mediates responses to osteocalcin in β -cells in vitro and pancreas in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2011.

PUCHACZ, E.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S.; WOZNEY, J.; HUEBNER, K.; CROCE, C. Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. **Endocrinology**, 1989.

SILVERMAN, J. F.; O'BRIEN, K. F.; LONG, S.; LEGGETT, N.; KHAZANIE, P. G.; PORIES, W. J.; NORRIS, H. T.; CARO, J. F. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. **The American journal of gastroenterology**, 1990.

TAM, A. B.; MERCADO, E. L.; HOFFMANN, A.; NIWA, M. ER Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1a and PERK. **PLoS ONE**, 2012.

YEAP, B. B.; ALFONSO, H.; PAUL CHUBB, S. A.; GAUCI, R.; BYRNES, E.; BEILBY, J. P.; EBELING, P. R.; HANDELSMAN, D. J.; ALLAN, C. A.; GROSSMANN, M.; NORMAN, P. E.; FLICKER, L. Higher serum undercarboxylated osteocalcin and other bone turnover markers are associated with reduced diabetes risk and lower estradiol concentrations in older men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2015.

YEAP, B. B.; CHUBB, S. A. P.; FLICKER, L.; MCCAUL, K. A.; EBELING, P. R.; BEILBY, J. P.; NORMAN, P. E. Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. **European Journal of Endocrinology**, 2010.

ZHOU, B.; LI, H.; XU, L.; ZANG, W.; WU, S.; SUN, H. Osteocalcin reverses endoplasmic reticulum stress and improves impaired insulin sensitivity secondary to diet-induced obesity through nuclear factor- κ b signaling pathway. **Endocrinology**, 2013.

ZOCH, M. L.; CLEMENS, T. L.; RIDDLE, R. C. New insights into the biology of osteocalcin. **Bone**, 2015.