



ACTUALIZACIONES / Review

ROL DE LA OSTEOCALCINA MÁS ALLÁ DEL HUESO

Marina Soledad Bonanno, Mariana Rey Saravia, Mariana Seijo, Susana Noemí Zeni*

Laboratorio de Osteopatías Metabólicas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET. Hospital de Clínicas José de San Martín, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina.

Resumen

Los hallazgos osteológicos se intensificaron en los últimos años. Se demostró que el esqueleto se comporta, además de sus funciones clásicas, como un órgano de secreción endocrina que sintetiza al menos dos hormonas: el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF-23) y la osteocalcina (Ocn).

La Ocn es un péptido pequeño que contiene 3 residuos de ácido glutámico. Estos residuos se carboxilan postraduccionalmente, quedando retenida en la matriz ósea. La forma decarboxilada en el primer residuo de ácido glutámico (GluOcn) fue reportada por poseer efectos biológicos; la resorción ósea es el mecanismo clave para su bioactivación.

La presente revisión se centra en los conocimientos actuales sobre la función hormonal de la Ocn. A la fecha se reporta que la Ocn regularía el metabolismo energético aumentando la proliferación de células β pancreáticas, y la secreción de insulina y de adiponec-

tina. Sobre el músculo esquelético actuaría favoreciendo la absorción y el catabolismo de nutrientes. La función reproductiva masculina estaría regulada mediante el estímulo a las células de Leydig para sintetizar testosterona; en el desarrollo cerebral y la cognición, la Ocn aumentaría la síntesis de neurotransmisores monoaminados y disminuiría el neurotransmisor inhibitorio GABA.

Si bien son indispensables mayores evidencias para dilucidar los mecanismos reguladores por medio de los cuales actuaría la Ocn, los resultados enumerados en los distintos estudios experimentales establecen la importancia de este novedoso integrante molecular. Dilucidar su rol dentro de estos procesos interrelacionados en seres humanos abriría la posibilidad de utilizar a la Ocn en el tratamiento de enfermedades endocrino-metabólicas.

Palabras clave: osteocalcina, metabolismo energético, fertilidad masculina, desarrollo cerebral.

*Correspondencia: Prof. Dra. Susana Noemí Zeni, Investigador Principal CONICET. Av. Córdoba 2351-8° piso (1120), CABA, Argentina. Tel-Fax: 541159508972.
E-mail: snzeni@hotmail.com

Abstract

ROLE OF OSTEOCALCIN BEYOND THE BONE

Osteological findings have intensified in recent years. The skeleton behaves as an endocrine secretion organ that synthesizes at least two hormones: osteocalcin (Ocn) and fibroblast growth factor 23 (FGF-23).

Ocn is a small peptide that contains 3 glutamic acid residues. After translation, these residues are carboxylated to make possible its retention into the bone matrix. Decarboxylation on the first glutamic acid residue (GluOcn) has been reported to have biological effects. Bone resorption is the key mechanism for its bioactivation.

This review focuses on current knowledge on Ocn hormonal function. It has been reported that Ocn regulates energy metabolism by increasing the proliferation of pancreatic

β cells, and the secretion of insulin and adiponectin. On the skeletal muscle, it may act by favoring the absorption and catabolism of nutrients. Male reproductive function might be regulated by stimulating Leydig cells to synthesize testosterone. Regarding brain development and cognition, Ocn would increase monoamine neurotransmitters synthesis and decrease inhibitory neurotransmitter GABA.

Although more evidence is needed to elucidate the regulatory mechanisms of Ocn, different experimental studies establish the importance of this novel molecular mediator. Clarifying its role within interrelated processes in humans, might open the possibility of using Ocn in different treatments of endocrine-metabolic diseases.

Key words: *osteocalcin, energetic metabolism, male fertility, brain development.*

Introducción

Históricamente, los primeros descubrimientos realizados en el campo de los estudios sobre el hueso fueron llevados a cabo por patólogos quienes, a través de la observación de la morfología de las células óseas, inferían su función y su regulación.¹ Consideraban el esqueleto como una estructura estática cuya única función radicaba en proteger a los órganos internos, proporcionar sostén al organismo y soportar la locomoción.² Como, al mismo tiempo, es el principal responsable del mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica, se determinó que cumplía además funciones homeostáticas.

La osteocalcina (Ocn) es la proteína no colágena más abundante de la matriz extracelular (MEC) del hueso. La expresión de Ocn coincide con la iniciación de la mineralización de la matriz en el hueso embrionario; por ello, en esos tiempos, se infirió que Ocn participaba en el proceso de mineralización de la MEC ósea.³

La Ocn es un péptido pequeño, altamente conservado,⁴ de 49 aminoácidos en los seres humanos (46 en ratones),⁵ que contiene 3 residuos de ácido glutámico en las posiciones 17, 21 y 24.^{2,6} La proteína nativa sufre pequeñas modificaciones postraduccionales: la escisión de un pre-pro-péptido⁷ y la carboxilación vitamina K-dependiente de sus residuos de ácido glutámico a ácido carboxiglutámico. Dichos residuos carboxilados aumentan la afinidad de la Ocn por el calcio (Ca) de los cristales de hidroxiapatita quedando así retenida en la MEC ósea donde constituye el 15% del total de las proteínas no colágenas^{2,8,9}. Para demostrar la función de Ocn en el proceso de mineralización, se les administró a roedores warfarina, inhibidor del mecanismo de carboxilación vitamina K-dependiente, observándose hipermineralización del hueso y cierre prematuro del cartílago de crecimiento. Sobre esa base se descartó su participación en el proceso de mineralización y su función permaneció así desconocida por muchos años.



A principios de la década de 1990, los hallazgos osteológicos se intensificaron gracias al advenimiento de las técnicas de ADN recombinante, que permitieron la creación de modelos animales genéticamente modificados.¹ Es así como, durante los últimos 20 años, se demostró que, además de sus funciones clásicas, el esqueleto se comporta como un órgano de secreción endocrina que sintetiza al menos dos hormonas: el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 23 (FGF-23), liberado por osteocitos a la circulación y que, actuando sobre los riñones, regula el metabolismo del fósforo,¹⁰ y la Ocn producida principalmente por osteoblastos (OBL), que le permitiría al esqueleto tener un rol crítico más allá del esqueleto.

Esta revisión se centra en los conocimientos actuales sobre la función de la Ocn en los procesos biológicos donde participa, analizando su posible relevancia en el ser humano tanto en condiciones normales como patológicas y su potencial acción terapéutica.

Fisiología

La actividad de las células óseas permite el crecimiento del hueso durante la niñez (modelado) y su mantenimiento en la edad adulta (remodelado). El desarrollo de ambos procesos se produce en dos etapas: formación ejercida por la actividad de osteoblastos (OBL) y resorción ejercida por osteoclastos (OCL).⁸

El proceso de diferenciación del OBL depende de la acción secuencial de una serie de citoquinas, incluyendo la vía canónica de las Wnt y la de los Hedgehogs.^{1,11} El OBL es una célula con intensa actividad sintética que secreta una gran cantidad de proteínas, como el colágeno tipo I y una serie de proteínas no colágenas, entre las que se incluye la Ocn.

La diferenciación de los precursores de OCL necesita de la señalización de dos citoquinas: el factor estimulante de colonias 1 (M-CSF) y el ligando del receptor activador

para el factor nuclear KB (RANKL), ambas secretadas por células estromales y OBL. Los precursores osteoclasticos expresan en su membrana receptores de ambas citoquinas: c-Fms y RANK, respectivamente. La señal RANK-RANKL inicia una cascada intracelular, dependiente de quinasas ERK, que induce la expresión de genes característicos del OCL como fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), catepsina K (CATK), receptor de calcitonina y β 3-integrina.¹² El inhibidor fisiológico de RANKL es la osteoprotegerina (OPG), también secretada por células estromales y OBL. La OPG actúa como un receptor soluble señuelo para RANKL, bloqueando su unión a RANK y, en consecuencia, la resorción ósea.²

La Ocn es sintetizada casi exclusivamente por OBL y, en muy pequeña cantidad, por odontoblastos y condrocitos hipertróficos. En los seres humanos se encuentra codificada por el gen *Bglap* localizado en el cromosoma 1 localización q25 (GenBank ID 632), y su síntesis está regulada por la vitamina D y el factor de transcripción Runx2.^{13,14}

El ambiente ácido que se genera durante la resorción osteoclastica promueve la decarboxilación de sus residuos carboxilados, produciendo la pérdida de afinidad por el Ca y su liberación a la circulación sistémica. En plasma, la Ocn existe en varias formas: totalmente carboxilada, parcialmente carboxilada y completamente descarboxilada;^{2,5} la forma descarboxilada en el primer residuo de ácido glutámico posee efectos biológicos (GluOcn);¹⁵ siendo la resorción ósea el mecanismo clave para su bioactivación.⁸

Hormona del osteoblasto

Las primeras evidencias de la función hormonal de Ocn fueron documentadas por el grupo de Karsenty y col. en 1996.¹⁶ Para sus ensayos utilizaron ratones modificados genéticamente, carentes del gen que codifica para la Ocn (Ocn^{-/-}),¹⁶ modelo que presenta la pérdida de función de la proteína. Estos ratones

son normales al nacimiento y no presentan anomalías en su patrón esquelético ni en la formación ectópica de huesos;¹⁶ sin embargo, a lo largo del tiempo, desarrollan un remodelado anormal con incremento de la masa ósea.¹⁶ Sobre esta base se descartó la función de la Ocn en el proceso de mineralización¹⁶ y se planteó la idea de que cumpliría roles en otros órganos blanco, fuera del hueso.¹⁶ Los ratones *Ocn*^{-/-} presentan, además, dos fenotipos inesperados. El fenotipo más notorio corresponde al gran aumento de la grasa abdominal y, el segundo, más subjetivo, es que se reproducen menos y en forma tardía.¹⁷ Estas alteraciones sugirieron que la Ocn influiría, al menos, en dos procesos fisiológicos que no afectan directamente al esqueleto: acumulación de grasa ventral y reproducción.¹⁷

Al reanalizar el comportamiento de la molécula de Ocn observaron que presentaba ciertas características hormonales. En este sentido, como la mayoría de las hormonas peptídicas, la Ocn se sintetiza como una pre-pro-molécula que se escinde secuencialmente en OBL, de modo que solo se secreta la proteína madura. Al igual que muchas hormonas, sus niveles siguen un ritmo circadiano y, en la circulación sistémica, se encuentran en el orden de los ng/ml, en todas las especies evaluadas. Asimismo, como ocurre con otras proteínas carboxiladas, su bioactivación se produce a través del proceso de decarboxilación.¹⁷

Con la evidencia acumulada por los ratones *Ocn*^{-/-} y sus características bioquímicas se postuló que la Ocn actuaría como una hormona peptídica secretada por OBL.¹⁷ El descubrimiento de la función hormonal de la Ocn amplió significativamente el campo de la biología ósea, debido a la serie de procesos fisiológicos en los cuales dicha proteína participa. A la fecha se ha demostrado que está involucrada en la regulación del metabolismo energético,⁸ la fertilidad masculina,¹⁸ la función muscular, el desarrollo cerebral y la cognición¹⁹ (Figura 1).

Osteocalcina en la regulación de la homeostasis de la glucosa

Durante el proceso de remodelado, la actividad de los OCL y OBL requiere un elevado suministro de energía.⁸ Para ello, ambos tipos de células envían señales acerca de sus necesidades energéticas a distintos sitios homeostáticos con el fin de que aporten su principal sustrato energético, la glucosa. Ambas células óseas presentan transportadores específicos de glucosa, entre los que se encuentra el transportador GLUT-4, dependiente de insulina (Ins). A nivel celular, el ATP generado por el metabolismo intermedio suministrará la energía y los esqueletos hidrocarbonados necesarios para la actividad biosintética de las células óseas. Otra fuente energética la constituyen los ácidos grasos libres (AGL) provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos acumulados en el tejido adiposo. Las células óseas también cuentan con mecanismos de transporte para AGL. Los niveles circulantes de ambos sustratos energéticos se encuentran regulados por distintas hormonas, entre las que se incluyen la Ins y leptina. Estas moléculas, al interactuar con sus receptores celulares específicos, afectan la expresión de genes que controlan los procesos bioenergéticos a nivel celular. La acción regulatoria ejercida por Ins y leptina permite ajustar la producción y el depósito de energía entre diferentes tejidos y, al mismo tiempo, informa el estado energético global a los distintos centros cerebrales que controlan la saciedad y el gasto energético.

Debido a que la mayoría de las reacciones endocrinas se encuentran reguladas recíprocamente, los científicos hipotizaron que tal vez las células óseas regulen el suministro de energía que requieren para cubrir sus necesidades metabólicas.⁸ Las primeras evidencias respecto de la regulación del metabolismo de la glucosa y la grasa corporal por Ocn fueron suministradas por los ratones *Ocn*^{-/-}.¹⁶ Estos acumulan una cantidad anormalmente alta de grasa visceral y presentan alteraciones seve-

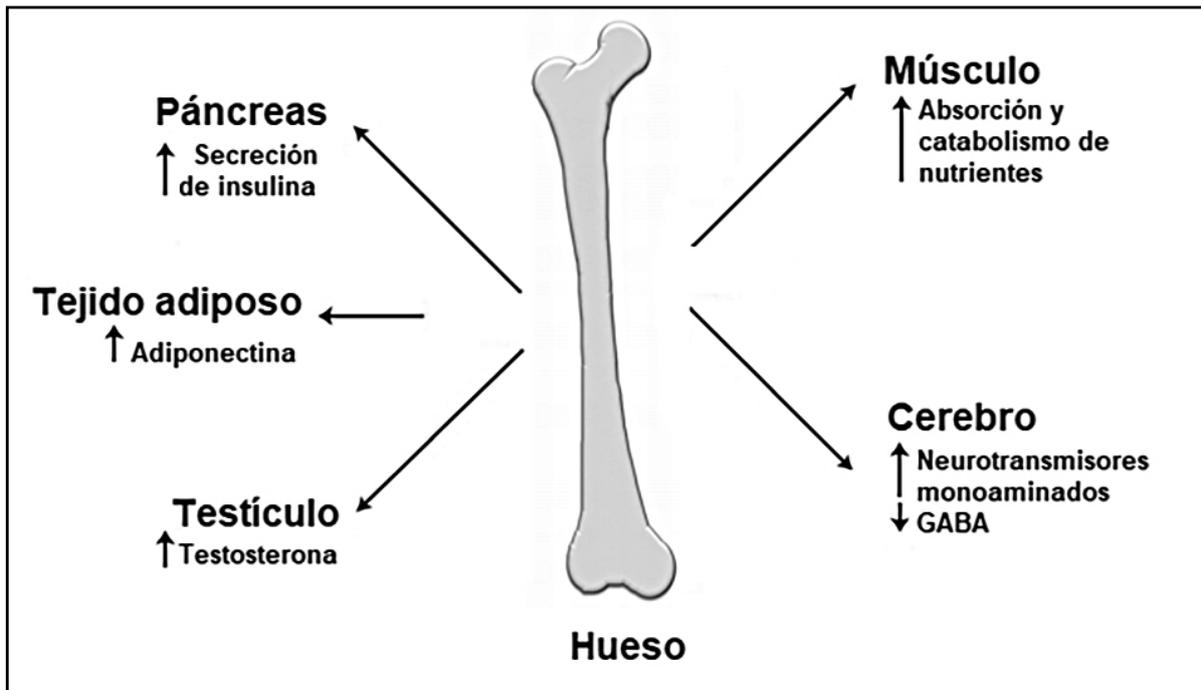


Figura 1. El esqueleto como órgano endocrino. La regulación endocrina ejercida por el tejido óseo sobre el metabolismo energético, la reproducción masculina y el desarrollo cerebral y la cognición estaría mediada por Ocn, proteína secretada específicamente por los osteoblastos (OBL). La Ocn regularía el metabolismo energético aumentando la secreción de insulina (Ins) y favoreciendo la proliferación de células β pancreáticas. En el tejido adiposo incrementaría la producción de adiponectina, hormona sensibilizaste a Ins. Sobre el músculo esquelético actuaría favoreciendo la absorción y catabolismo de glucosa y ácidos grasos libres (AGL) por las miofibras. La función reproductiva masculina estaría regulada mediante el estímulo a las células de Leydig para sintetizar testosterona. Con respecto al desarrollo cerebral y la cognición, la Ocn aumentaría la síntesis de neurotransmisores monoaminados (serotonina, dopanima y noradrenalina) y disminuiría el neurotransmisor inhibidor ácido gamma-aminobutírico (GABA).

ras en el metabolismo de la glucosa (hiperglucemia, hipoinsulinemia, bajo número de células β pancreáticas, disminución del gasto energético y niveles séricos reducidos de adiponectina).^{8,4}

El receptor huérfano GPRC6A, miembro de la familia de proteínas de membrana asociadas a proteína G, fue reportado como el receptor para la GluOcn.^{18,20} Los modelos murinos carentes del gen que codifica para este receptor (GPRC6A^{-/-}) presentan un fenotipo similar a los desórdenes metabólicos propios de los ratones Ocn^{-/-}.⁵ La señal GluOcn-

GPRC6A activa quinasas ERK iniciando una cascada de señalización intracelular, tanto en células β pancreáticas, como en adipocitos y células de Leydig.² La señalización de GluOcn en las células β pancreáticas aumenta la expresión de los genes *Ins1* e *Ins2* que codifican para pre-pro-Ins. Asimismo, dicha señalización activa los genes de las quinasas dependientes de ciclinas *Cdk4*, *Ccnd1* y *Ccnd2* que regulan el ciclo celular, aumentando la proliferación de las células β y, en consecuencia, la producción de Ins,^{2,8} no solo en adultos sino también durante el desarrollo

embrionario.² La señalización de GluOcn en adipocitos induce la acumulación de AMPc y la consecuente activación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB). Este hecho activa al receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ) e induce la expresión del gen *Adipoq*, que codifica para la adiponectina.¹¹ En conjunto, estos resultados demuestran que la señal GluOcn-GPRC6A actuaría directamente sobre los islotes pancreáticos aumentando la proliferación de las células β , la expresión y secreción de Ins,² mejorando el gasto de energía y, en los adipocitos, aumentando la expresión de adiponectina, hormona sensibilizante de la Ins.^{4,21}

Los OBL expresan receptores de membrana funcionales para Ins (RIIns)² cuya señal estimula la síntesis de marcadores anabólicos óseos, modula la síntesis de colágeno, la producción de fosfatasa alcalina (FAL), la capacidad de respuesta a la hormona paratiroidea (PTHrP) y la captación de glucosa.⁵ El RIIns se encuentra regulado negativamente por una proteína osteotesticular tirosina fosfatasa (OST-PTP), codificada por el gen *Esp* (*Ptprv*) que se expresa en células madre embrionarias, células de Sertoli y en precursores de OBL.⁵ La activación del gen *Esp* estimula la producción de OST-PTP y, con ello, la inactivación rápida del RIIns, lo que permite controlar la homeostasis de la glucosa evitando el desarrollo de hipoglucemia.¹² El ratón *Esp*^{-/-} presenta tanto expresión como niveles séricos de Ocn normales pero, al mismo tiempo, contiene altas concentraciones de GluOcn.⁵ Esto sugirió que la señal Ins-RIIns manifestaría un comportamiento dual: actuando directamente sobre OBL⁵ regulando la expresión de Ocn, e indirectamente sobre OCL regulando la bioactivación y liberación a la circulación sistémica de la GluOcn.⁸

Años más tarde se determinó que, a nivel molecular, la señal Ins-RIIns en OBL bloquea la supresión que el factor nuclear Twist2 ejerce sobre Runx2, favoreciendo la diferencia-

ción del pre-OBL y la producción de Ocn.⁸ Asimismo, dicha señal regula la producción de Ocn y su activación a través de FOXO1 y ATF4.⁴ En ausencia de la señal Ins-RIIns, FOXO1 induce la expresión de los genes *Esp* y *Opg* e interactúa físicamente con Runx2 impidiendo su unión al sitio del promotor del gen *Bglap*.¹¹ La activación del gen *Esp* induce la fosforilación del RIIns y la activación del gen *Opg* aumenta la producción de OPG. Como resultado de esto último, la relación RANKL/OPG disminuye, y en consecuencia la proliferación y diferenciación de los precursores osteoclastos, inhibiendo la resorción ósea y, al mismo tiempo, reduciendo la bioactivación de la Ocn.²² ATF4 induce la expresión del gen *Esp* actuando en forma conjunta con FOXO1.¹¹ En presencia de la señal Ins-RIIns, FOXO1 es fosforilado, lo que reduce su habilidad para activar a los promotores de los genes *Esp* y *Opg* e inhibir a Runx2.¹¹ Este hecho aumenta en forma directa la expresión de Ocn por los OBL, pero al mismo tiempo, inhibe la producción de OPG, aumentando la relación RANKL/OPG. Este aumento relativo de RANKL favorece la actividad osteoclastica y el incremento de la expresión de la proteasa CATK y del componente de la bomba de protones Tcigr1. El aumento de este último componente facilita el transporte de protones a la laguna de resorción osteoclastica e incrementa la acidificación de la MEC ósea. La disminución del pH, ~4,5, facilita la decarboxilación de Ocn y su liberación a la circulación sistémica.¹¹ En consecuencia, se crea una retroalimentación donde la señal Ins-RIIns en OBL promueve su diferenciación celular, la producción de FAL y RANKL y, al mismo tiempo, favorece la producción de GluOcn por el OCL^{2,8} y la señal GluOcn-GPR6A en las células β pancreáticas promueve su proliferación y la producción y secreción de Ins.

Esta retroalimentación Ins-GluOcn se ve contrarrestada por la acción de la leptina.⁸ La leptina es una hormona pleiotrópica, codificada por el gen *Ob*, secretada y liberada a la cir-



culación sistémica, principalmente, por el tejido adiposo blanco,²² implicada en el control del metabolismo energético que participaría también de la modulación de la masa ósea. A nivel del OBL regula el metabolismo de la glucosa inhibiendo la secreción de Ins,²³ asimismo es un regulador negativo de la formación y la resorción ósea, es decir, de la producción y bioactivación de Ocn.⁸

En la actualidad no se encuentra completamente dilucidado el mecanismo molecular por el cual la leptina regula la actividad del OCL y del OBL, pero se reporta que tendría una acción dual. Por un lado, ensayos *in vitro* demostraron que podría ejercer una acción directa sobre los OBL estimulando su proliferación e inhibiendo el reclutamiento de OCL dependientes de OBL²⁴. Pero la mayoría de los estudios *in vivo* demostraron que podría ejercer efectos indirectos actuando a nivel central sobre el tono simpático.²² En este sentido, el grupo de Karsenty²⁵ reportó por primera vez la vía endocrina central de regulación de la leptina sobre la masa ósea, hacia el año 2000. La leptina atraviesa la membrana hematoencefálica, uniéndose a su receptor (RLep) asociado a la quinasa de Janus 2 (Jak2) expresado en las neuronas productoras de serotonina del núcleo de Rafé en el tronco encefálico.²⁶ La señal leptina-RLep activa Jak2, que fosforila residuos del RLep, en particular el residuo tirosina 985; este disminuye la expresión del gen que codifica para la enzima triptófano hidroxilasa 2 (Tph2),²⁶ enzima que cataliza el primer paso de la biosíntesis de serotonina. Las neuronas de los núcleos de Rafé se proyectan hacia los núcleos hipotalámicos ventromediales.²⁶ Allí, la señal leptina-RLep, activan a CREB, induciendo la expresión de genes involucrados en la síntesis de catecolaminas,²⁶ en particular aumentan la secreción de norepinefrina²⁴ activando el sistema nervioso simpático (SNS).^{8,23} Esta acción es controlada por el supresor de la señal de citoquinas 3 (Socs3) que, al unirse a Jak2, evita la fosforilación del RLep. Las células óseas se

encuentran invadas por neuronas del SNS y tienen receptores β_2 adrenérgicos (Adr β_2). El aumento de la secreción de norepinefrina actúa sobre los receptores Adr β_2 inhibiendo la proliferación y diferenciación osteoblástica y suprimiendo la formación ósea.⁸

La resorción ósea, y por lo tanto la descarboxilación y la actividad de la Ocn, están reguladas positivamente por la señalización de Ins en los OBL. En contraste, la leptina, a través de la estimulación central del SNS, inhibe indirectamente la activación de Ocn (Figura 2).⁸

La retroalimentación que se genera entre GluOcn e Ins en modelos murinos puede observarse también en seres humanos. Los niveles de GluOcn sérica correlacionan negativamente con el índice de masa corporal (IMC), la cantidad de masa grasa y los niveles de glucosa en plasma,⁸ la obesidad y el HOMA-IR, y positivamente con los niveles de adiponectina e Ins.² Los adultos con síndrome metabólico tienen niveles séricos menores de Ocn y GluOcn en comparación con aquellos sin síndrome metabólico, independientemente del IMC.²⁷ Además, los individuos obesos también presentan una disminución de hasta un 40% en los niveles circulantes de Ocn y GluOcn, en comparación con individuos delgados.²⁷

Osteocalcina, músculo y ejercicio

El músculo esquelético desempeña un rol dominante en el control del metabolismo energético sistémico y en la sensibilidad a Ins.¹⁷ La mayoría de la glucosa de la dieta se incorpora al músculo esquelético en respuesta a la Ins, almacenando el exceso de glucosa en las miofibras como glucógeno muscular.¹⁷ El músculo emite señales para modular la homeostasis de la energía sistémica, a través de la expresión y liberación de péptidos biológicamente activos que actúan como factores autocrinos, paracrinos o endocrinos.¹⁷ Entre estas miocinas podemos citar a IL-4, IL-6, miostatina, IGF-1, FGF-2, etcétera.²⁸

En respuesta al ejercicio, la función muscular aumenta significativamente, lo que re-

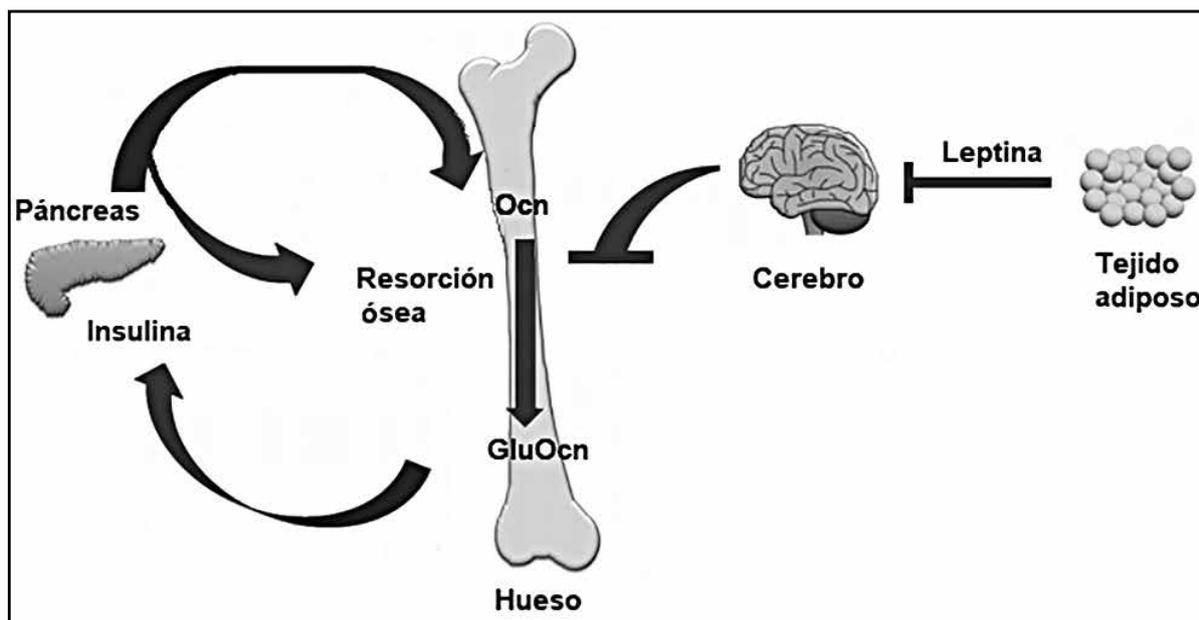


Figura 2. Representación esquemática de la comunicación entre el metabolismo óseo y el energético. La Ocn es secretada por OBL y es retenida en la MEC ósea. Se activa y libera por descarboxilación durante la resorción ósea. GluOcn actuaría sobre las células pancreáticas aumentando su proliferación y potenciando la producción y liberación de Ins. La Ins estimula la producción de Ocn y RANKL por OBL, favoreciendo la actividad osteoclastica y, en consecuencia, la resorción ósea y la bioactivación de Ocn, liberándola a circulación sistémica. La leptina secretada por los adipocitos, a través de la señalización neuronal del tronco encefálico inhibe la producción de serotonina cerebral, con lo cual aumenta el tono simpático. Este último es un regulador negativo de la resorción ósea al inhibir la activación de Ocn.

quiere aumentar la captación y el catabolismo de glucosa y AGL.^{29,30} Sin embargo, durante la actividad física, los niveles circulantes de Ins disminuyen y, como además esta molécula no participa en el catabolismo de la glucosa,^{29,31} se postuló que otras moléculas u hormonas regularían el aporte energético durante el ejercicio.³⁰

La capacidad del hueso para detectar fuerzas mecánicas, la proximidad física con el músculo y el hecho de que tanto la capacidad para realizar ejercicios como la masa ósea disminuyen al mismo tiempo, sugieren una interrelación entre el hueso y el músculo.³⁰ Varios estudios previos establecen la existencia de tal interrelación. En este sen-

tido, el grupo de Karsenty demostró que los niveles séricos de Ocn disminuyen bruscamente en la mitad de la vida de los vertebrados,²⁹ concordante con la disminución en la masa muscular y en la capacidad para realizar ejercicio.³⁰ Asimismo, el ejercicio aumenta los niveles de Ocn y GluOcn sérica tanto en hombres como en mujeres.^{30,27} Al estudiar el motivo del aumento en los niveles séricos de GluOcn se observó que no se producen en la misma magnitud en ratones adultos y en ratones jóvenes.²⁹ Estos hallazgos sugieren que la Ocn sería la molécula que actuaría como nexo entre el músculo y el hueso, regulando el metabolismo de la glucosa, fuente principal de energía para los músculos durante el ejercicio.



Mediante el uso de los ratones GPRC6A^{-/-} específicamente en las miofibras se demostró que la señalización de GluOcn es necesaria para aumentar la capacidad de realizar ejercicio. En este sentido, GluOcn favorece la captación de glucosa y AGL (función que comparte con la Ins) pero, al mismo tiempo, potencia el catabolismo de ambos nutrientes para generar ATP.³² El mecanismo implicado presenta tres pasos: la señalización de GluOcn en las miofibras favorece, primeramente, la descomposición del glucógeno.²⁹ En segundo lugar, promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática y, por lo tanto, mejora la captación de glucosa y la glucólisis.²⁹ Finalmente, aumenta la captación de AGL y su catabolismo,²⁹ aumentando la expresión de acil-CoA deshidrogenasa, enzima clave de la ruta metabólica de oxidación de AGLs.⁸ A través de estas tres funciones combinadas, la señalización de GluOcn en las miofibras promueve la actividad del ciclo de Krebs y la producción de ATP, necesario para aumentar la función muscular²⁹ (Figura 3).

La Ocn también favorece la función muscular durante el ejercicio aumentando la expresión y liberación de IL-6.²⁹ Esta miocina promueve la utilización de nutrientes por las fibras musculares esqueléticas, la producción de glucosa en el hígado y la lipólisis en el tejido adiposo.¹⁵ Asimismo, la IL-6 actuaría sobre las células de linaje osteoblástico promoviendo la actividad resorptiva del OCL, y la consiguiente bioactivación de la Ocn¹⁵ (véase Figura 3).

La administración de GluOcn a ratones jóvenes y adultos, tanto en forma aguda (justo antes de un ejercicio de resistencia) como en forma crónica durante un mes, indujeron una ganancia sorprendentemente alta en la capacidad para realizar ejercicios, en ambos ratones. La señalización de GluOC indujo una ganancia de masa muscular en los ratones jóvenes mientras que, en los adultos, mantuvo la masa muscular promoviendo la síntesis de

proteínas en las células musculares, sin afectar su degradación.³²

Si bien se requieren mayores evidencias para dilucidar el mecanismo de regulación de la actividad muscular por Ocn, estos resultados sugieren que Ocn sería necesaria y suficiente para prevenir la pérdida muscular relacionada con la edad. Este hecho colocaría a la Ocn y su receptor como sitios terapéuticos promisorios para combatir la disminución de la fuerza muscular relacionada con la edad o aliviar el efecto de enfermedades musculares. Considerando que el rol de la Ocn en la función muscular ha sido reportado muy recientemente, se deberían ampliar el número de estudios clínicos para obtener conclusiones definitivas sobre la aplicación terapéutica de la Ocn en la comunicación hueso-músculo.

Osteocalcina en la reproducción masculina

Durante la pubertad, el esqueleto está influenciado por hormonas sexuales que estimulan el crecimiento óseo,⁸ en ambos géneros, la caída de esteroides sexuales da lugar a la pérdida paulatina de masa ósea.³³ El grupo de Karsenty planteó la posibilidad de que la Ocn tuviera capacidad endocrina reguladora de las funciones reproductivas femeninas, debido al rol central de la leptina sobre la reproducción y el remodelado óseo, junto al efecto de retroalimentación ejercido por la Ocn.³²

Los primeros ensayos consistieron en añadir sobrenadante de cultivos de OBL murinos productores de Ocn y de OBL Ocn^{-/-} a pequeños trozos de tejido ovárico, utilizando como control negativo el tejido testicular y cultivos de células de Leydig, productoras de testosterona (To).^{32,34} Los resultados fueron inesperados, ya que demostraron que la GluOcn incrementaba la producción de To por las células de Leydig en cultivo y en tejido testicular,³³ favoreciendo la expresión de los genes que codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis de To.¹⁸ Esta capacidad era única de los OBL, ya que ningún otro sobrenadante de cultivos de células mesenquimales lograba aumentar los niveles de To.³²

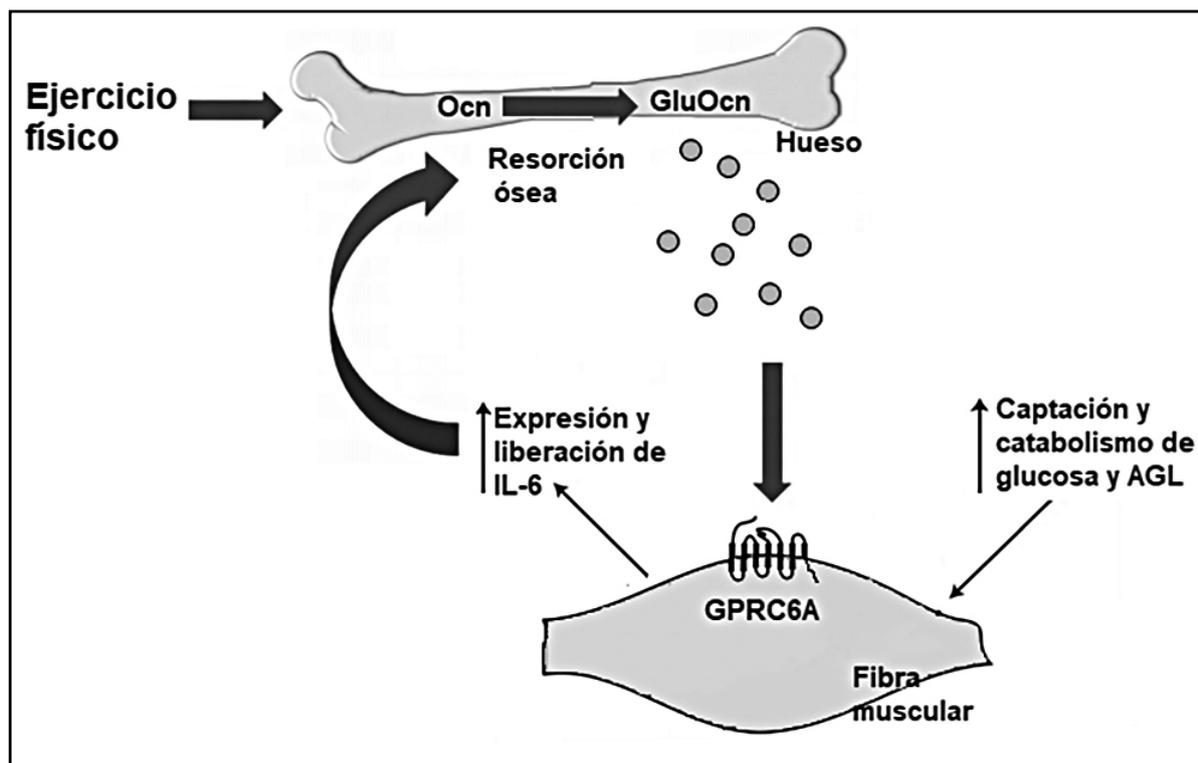


Figura 3. IL-6 favorece la producción de osteocalcina decarboxilada durante el ejercicio. Representación esquemática que ilustra cómo la señalización de Ocn en miofibras y la IL-6 derivada de los músculos esqueléticos cooperan para favorecer la adaptación al ejercicio.

Incluso ninguno de los sobrenadantes, incluido el cultivo de OBL, alteraban la producción de hormonas sexuales en tejido ovárico, debido a que la GluOcn no tiene efecto sobre la expresión del gen *Cyp19* que codifica para las enzimas capaces de convertir la To en estradiol.^{17,18,34} Más adelante se confirmó que el receptor GPRC6A no se expresa en las células foliculares de los ovarios, tanto en ratones como en seres humanos, demostrando que la señal de Ocn solo afecta la esteroidogénesis testicular.⁶

Diversos ensayos *in vivo* utilizando ratones machos *Ocn*^{-/-} evidenciaron la presencia de menores niveles de To en sangre, bajos niveles de reproducción, con una disminución en el tamaño de los testículos, epidídimo y vesículas seminales, una disminución del 50% en el número de espermatozoides y pobre maduración de las células de Leydig.^{33,34} Los ratones

Ocn^{-/-} específicamente en los OBL presentan también baja producción de To, mientras que el fenotipo de los ratones *Ocn*^{-/-} en células de Leydig no presentó dicha alteración.³⁴

Sobre la base de estos ensayos se postuló que la Ocn sería una hormona ósea que actuaría en forma endocrina, junto al eje hipotálamo-pituitario-gonadal, regulando la reproducción masculina, al incrementar la maduración de las células de Leydig y la producción de To.⁶ Pero la resorción osteoclástica que lleva a la decarboxilación y consecuente bioactivación de la Ocn es el determinante fisiológico del eje páncreas-hueso-testículo.^{6,34} La señal GluOcn-GPRC6A en células de Leydig desencadena un aumento en la producción de AMPc,⁶ lo cual activa el factor de transcripción CREB, que controla la expresión de varios genes que codifican para las enzimas



de la biosíntesis de To.⁶ El gen *StAR* codifica para la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), crucial para el transporte de colesterol a las mitocondrias donde se inicia la biosíntesis de esteroides. El gen *Cyp11a* codifica la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}) que cataliza el primer paso, donde se convierte el colesterol en pregnenolona. Los genes *3 β -HSD* y *Cyp17* codifican dos enzimas requeridas durante la conversión de pregnenolona a To^{18,35} (Figura 4).

Existen consistencias entre el rol de la Ocn en la reproducción de ratones y su función endocrina en seres humanos.⁶ Los niveles de Ocn y el recambio óseo se asocian con los niveles circulantes de To en la población general y en pacientes con trastornos óseos.^{6,36}

Además, también se ha demostrado que existe una asociación significativa entre los niveles de GluOcn sérica y los niveles de To durante la pubertad en hombres.^{36,37} Las evidencias genéticas se demostraron al estudiar individuos con insuficiencia testicular periférica, un síndrome bien definido en los seres humanos.^{6,38} Una mutación puntual (T>A) en el exón 4 del gen que codifica para el receptor GPRC6A da como resultado una sustitución de aminoácidos (F464Y) en una región altamente conservada de uno de los dominios transmembrana de GPRC6A. Este mecanismo impide su localización en la membrana celular, lo cual conduce a la pérdida de la función de dicho receptor.⁶ Estos sujetos poseen un fenotipo similar al fenotipo encontrado en los ratones *Ocn*^{-/-} y *GPRC6A*^{-/-}.^{18,34}

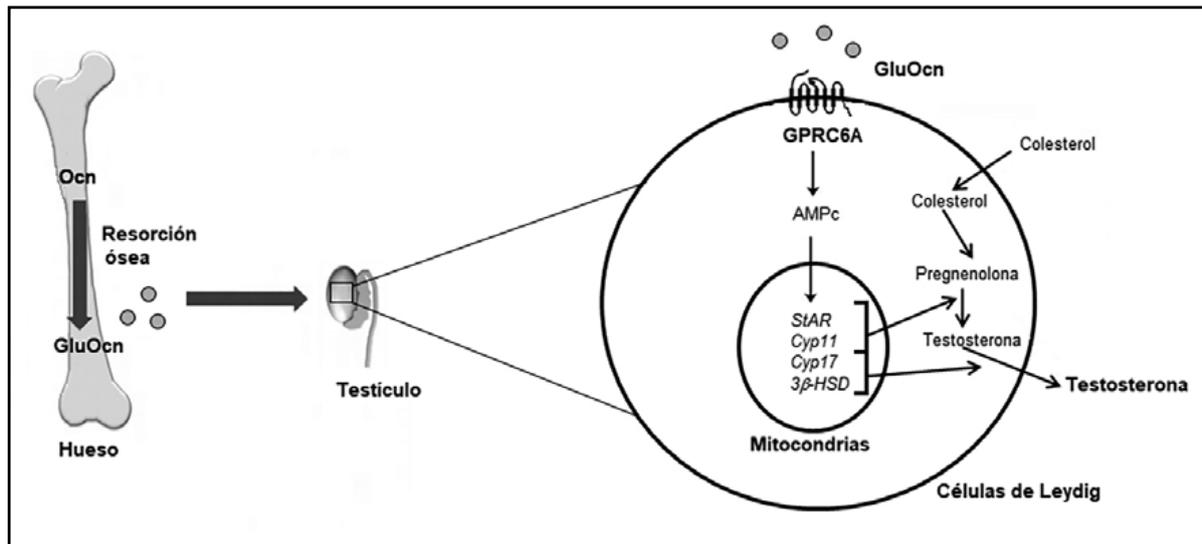


Figura 4. Acción molecular de Ocn en la regulación de la fertilidad masculina. La señal GluOcn-GPRC6A en células de Leydig favorece la producción de AMPc que conduce a la activación del factor de transcripción CREB. CREB activa la expresión de varios genes que codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis de testosterona, como *StAR*, *Cyp11a*, *3 β -HSD* y *Cyp17*. La proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) es crucial para el transporte de colesterol a las mitocondrias donde se inicia la biosíntesis de esteroides. *Cyp11a* codifica la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}) que cataliza el primer paso que convierte el colesterol en pregnenolona. *3 β -HSD* y *Cyp17* son dos enzimas requeridas durante la conversión de pregnenolona a testosterona. La testosterona es una hormona esteroidea sexual necesaria para muchas de las funciones testiculares, como la supervivencia de las células germinales y la espermatogénesis.

Osteocalcina, desarrollo cerebral, memoria y cognición

Impulsados por el comportamiento pasivo de los ratones *Ocn*^{-/-32} y por el hecho de que los niveles séricos de GluOcn decaen en todos los vertebrados con la edad,³⁰ se planteó la hipótesis respecto de que la *Ocn* también regularía funciones cognitivas.

El fenotipo pasivo no se podía atribuir al hipogonadismo de estos animales ya que este comportamiento era observado tanto en ratones machos como hembras.¹⁷ Los ratones *Ocn*^{-/-} muestran un aumento de ansiedad y depresión junto a pobre habilidad de aprendizaje y memoria.^{17,32} Anatómicamente, el cerebro de los ratones *Ocn*^{-/-} es más pequeño y presenta hipocampo hipoplásico, con una disminución del 30% del área cubierta por la circunvolución dentada y carente de cuerpo calloso.¹⁹ Bioquímicamente, los niveles de todos los neurotransmisores monoaminados (serotonina, dopamina y noradrenalina) se encuentran reducidos entre 20-50%, tanto en el cerebro medio como en el tronco encefálico.¹⁹ Al mismo tiempo, la acumulación de ácido gamma-aminobutírico (GABA), neurotransmisor inhibitorio, se incrementa entre 15-30%, en las mismas áreas del cerebro.¹⁹ Estas anomalías son secundarias, al menos en parte, a eventos transcripcionales, ya que la expresión de los genes necesarios para la síntesis de los neurotransmisores monoaminados disminuye entre 15-50%, mientras que la expresión de dos genes (*Gad1* y *Gad2*) necesarios para la síntesis de GABA se incrementan casi 50% en tallo cerebral.¹⁹

Los ratones *Ocn*^{-/-}, específicamente en los OBL experimentaron las mismas anomalías moleculares y fenotípicas.³⁹ Los animales con inactivación posnatal de *Ocn* presentan un aumento significativo en el comportamiento similar a la ansiedad y a la depresión, pero el aprendizaje espacial y la memoria solo se vieron modestamente afectados.³⁹ Los ratones *GPRC6A*^{-/-}, que comparten con los ratones *Ocn*^{-/-} su fenotipo metabólico y reproduc-

tivo, no presentan anomalías conductuales, debido a que el receptor *GPRC6A* no se expresa en cerebro.³⁹

La administración de GluOcn a través de una infusión intracerebro-ventricular a ratones *Ocn*^{-/-} y a ratones añosos indujo la recuperación completa de las anomalías conductuales similares a la ansiedad y la depresión, así como también a la anormal expresión génica,^{32,39} mientras que el aprendizaje espacial y los defectos de memoria se restauraron solo parcialmente.³⁹

Si bien GluOcn no se expresa en ninguna parte del cerebro,³⁹ es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, donde se une a las neuronas de los núcleos de Rafé dorsales en el tallo cerebral (que contiene todas las neuronas serotoninérgicas del cerebro), a las del área tegmental ventral en el mesencéfalo y a las de la sustancia negra (dos núcleos dopaminérgicos) y, también, a las de la región CA3 del hipocampo.^{17,19} En dichas zonas, la GluOcn favorece la síntesis de todos los neurotransmisores monoaminados y disminuye la síntesis de GABA (Figura 5).³² Este hecho se debe a que la señalización a través de GluOcn regula la expresión de enzimas neuronales clave para la síntesis de dichos neurotransmisores.^{32,39} Además, previene la apoptosis neuronal en el hipocampo.³²

Recientemente se identificó un segundo receptor, que transduce la señal de GluOcn en las neuronas.⁴⁰ Los ensayos genéticos, electrofisiológicos, moleculares y conductuales identifican a *GPR158*, un receptor huérfano acoplado a proteínas G y expresado en las neuronas de la región CA3 del hipocampo, como el transductor de la regulación de la GluOcn sobre la memoria dependiente del hipocampo.⁴⁰ La señal GluOcn-*GPR158* incrementa la producción de inositol 1,4,5 trifosfato (*IP*₃) y actúa a través de la señalización del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).⁴⁰

La *Ocn* materna es necesaria para el desarrollo normal del cerebro fetal.⁴¹ Durante la

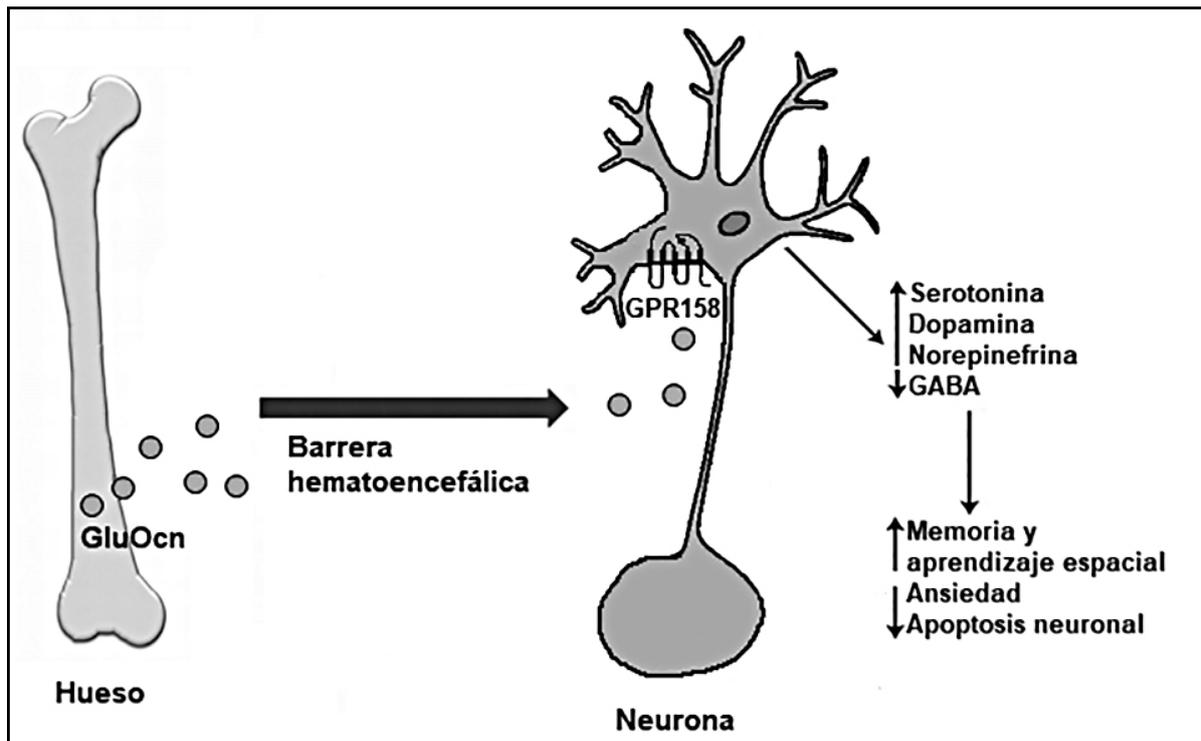


Figura 5. GluOcn promueve el aprendizaje espacial y la memoria y previene la ansiedad. GluOcn cruza la barrera hematoencefálica para acceder al cerebro, donde se une a las neuronas de la región CA3 del hipocampo, a las neuronas del área tegmental ventral (VTA) del mesencéfalo y a las neuronas del núcleo Rafé dorsal (DRN) y el núcleo Rafé medio (MRN) del tronco cerebral. Actúa, a través de eventos transcripcionales, para incrementar la síntesis de todos los neurotransmisores monoaminados (dopamina, serotonina y noradrenalina) y disminuir la síntesis de GABA, promoviendo el aprendizaje espacial y la memoria y disminuyendo la ansiedad. La señal GluOcn-GPR158 en la región CA3 del hipocampo promovería un incremento en la acumulación de IP_3 como segundo mensajero y, eventualmente, incrementa la expresión y síntesis del BDNF un mediador de la cognición.

embriogénesis, la Ocn se puede encontrar en la sangre fetal (E14.5) antes de que se exprese durante el desarrollo óseo (E16.5).^{41,42} Algunos experimentos adicionales demostraron que la Ocn no se expresa en la placenta, pero es capaz de atravesarla, lo que indica que la Ocn embrionaria es de origen materno.^{39,42} En ausencia de GluOcn materna y endógena, los embriones muestran una dilatación de los ventrículos laterales del cerebro y un aumento en el número de células apoptóticas en el hipocampo.⁴¹ Sin embargo, las inyecciones

diarias de GluOcn a ratones hembra gestantes $Ocn^{-/-}$ corrigen tal fenotipo anatómico y también se recupera parcialmente el déficit en aprendizaje y memoria de la descendencia.^{39,42} Estos resultados explicarían, al menos en parte, la alta incidencia de trastornos neuropsiquiátricos en niños nacidos de mujeres que sufren de desnutrición durante el embarazo. En ellas, el déficit en la señalización de la Ocn induciría alteraciones en el correcto desarrollo del cerebro e influiría en la función cognitiva de la descendencia en la adultez.³⁹

En los seres humanos, las numerosas anomalías óseas con deterioro cognitivo o alteraciones neurológicas asociadas sugieren una estrecha interacción de hueso y cerebro.⁴² Los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan un remodelado óseo aumentado y desarrollo de osteoporosis, respecto de personas sanas de la misma edad.⁴³ En relación con la pérdida de memoria vinculada a la edad, las personas con menor densidad mineral ósea (DMO) tienen un riesgo dos veces mayor de demencia,⁴⁴ lo que respalda la noción de que la alteración del hueso puede estar asociada a procesos cognitivos y de envejecimiento.

La displasia cleidocraneal (CCD) es una displasia esquelética clásica en la cual las funciones cognitivas también se ven afectadas.⁴⁵ Dicha enfermedad autosómica dominante es causada por la haploinsuficiencia en el locus *Runx2*.⁴⁵ Los estudios de ratones *Runx2*^{+/-} (modelo animal para estudiar CCD) mostraron las primeras evidencias de que el remodelado óseo afecta las funciones cerebrales como la cognición y el comportamiento, similar a la ansiedad.⁴⁵ Se probó que la haploinsuficiencia de *Runx2*, un factor de transcripción expresado exclusivamente en células progenitoras de OBL y en OBL maduros, regula los niveles circulantes de GluOcn,⁴⁵ modulando su expresión y bioactivación a través de la resorción ósea.⁴⁵ Estas observaciones indican que la alteración del remodelado óseo sería suficiente para obstaculizar el aprendizaje espacial y la memoria.

Conclusiones

Con la evidencia acumulada sobre el rol regulatorio que la Ocn ejerce sobre el meta-

bolismo de la glucosa, se sugirió la importancia de dicha molécula en el posible tratamiento de enfermedades metabólicas, incluido el síndrome metabólico, que aumenta el riesgo de patologías que presentan un incremento en su prevalencia a nivel mundial tales como diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, infertilidad y cáncer.² Asimismo, se planteó la utilización de GluOcn como terapéutica farmacológica para prevenir la pérdida muscular y los desórdenes neurológicos relacionados con la edad. Con respecto al desarrollo cerebral, la GluOcn influiría en la actividad neuronal, la expresión génica, la síntesis de neurotransmisores y, finalmente, el comportamiento, similar a la ansiedad, aprendizaje espacial y memoria.¹⁹

Si bien son indispensable mayores evidencias para dilucidar los mecanismos reguladores por medio de los cuales actuaría la Ocn, los resultados “enumerados en los distintos estudios experimentales evaluados en esta revisión” establecen la importancia de este novedoso integrante molecular en la regulación del metabolismo de la glucosa y la masa grasa, el músculo y el ejercicio, la fertilidad masculina y el desarrollo cerebral y la cognición. Establecer, con exactitud, su rol dentro de estos procesos interrelacionados en los seres humanos, abriría la posibilidad de utilizar la Ocn en el tratamiento de enfermedades endocrino-metabólicas.

Conflicto de interés: todos los autores no reportan conflictos de interés.

Recibido: mayo 2019
Aceptado: agosto 2019



Referencias

1. Battaglini R. El esqueleto como órgano endocrino: funciones metabólicas de la osteocalcina. *Actual Osteol* 2017; 13(3):225-32.
2. Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Hirata M. Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochem Pharmacol* 2017; 132:1-8.
3. Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(5):1447-51.
4. Tangseefa P, Martin SK, Fitter S, Baldock PA, Proud CG, Zannettino ACW. Osteocalcin-dependent regulation of glucose metabolism and fertility: Skeletal implications for the development of insulin resistance. *J Cell Physiol* 2018; 233:376983.
5. Oldknow KJ, MacRae VE, Farquharson C. Endocrine role of bone: recent and emerging perspectives beyond osteocalcin. *J Endocrinol* 2015; 225:R1-R19.
6. De Toni L, Di Nisio A, Rocca MS, De Rocco Ponce M, Ferlin A, Foresta C. Osteocalcin, a bone-derived hormone with important andrological implications. *Andrology* 2017; 5(4):664-70.
7. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130:456-69.
8. Ducy P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia* 2011; 54(6):1291-7.
9. Montecinos BR, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43(2):177-93.
10. Fukumoto S, Shimizu Y. Fibroblast growth factor 23 as a phosphotropic hormone and beyond. *J Bone Miner Metab* 2011; 29(5):507-14.
11. Rodda SJ. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 2006; 133:3231-44.
12. Muñoz-Torres M, Higuera López-Frías M, Fernández García D. Avances en el conocimiento de la biología del osteoclasto: el sistema osteoprotegerina-ligando del RANK. *Med Clínica* 2004; 122:75-7.
13. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999; 13:1025-36.
14. Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, et al. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 1997; 16(3):307-10.
15. Mera P, Ferron M, Mosialou I. Regulation of energy metabolism by bone-derived hormones. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8(6):a031666.
16. Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382(6590):448-52.
17. Karsenty G, Olson EN. Bone and muscle endocrine functions: unexpected paradigms of inter-organ communication. *Cell* 2006; 164:1248-56.
18. Oury F, Sumara G, Sumara O, et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 2011; 144:796-809.
19. Obri A, Khrimian L, Karsenty G, Oury F. Osteocalcin in the brain: from embryonic development to age-related decline in cognition. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(3):174-82.
20. Pi M, Wu Y, Quarles LD. GPRC6A mediates responses to osteocalcin in β -cells in vitro and pancreas in vivo. *J Bone Miner Res* 2011; 26:1680-3.
21. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105:5266-70.
22. Zeni SN. Remodelamiento óseo, control del sistema nervioso central y rol de la leptina. *Actual Osteol* 2009; 5:171-9.
23. Kanazawa I. Osteocalcin as a hormone

- regulating glucose metabolism. *World J Diabetes* 2015; 6(18):1345-54.
24. Motyl KJ, Rosen CJ. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. *Biochimie* 2012; 94:2089-96.
 25. DUCY P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin Inhibits Bone Formation through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass. *Cell* 2000; 100(2):197-207.
 26. Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* 2012; 481(7381):314-20.
 27. Levinge I, Brennan-Speranza TC, Zulli A, et al. Multifaceted interaction of bone, muscle, lifestyle interventions and metabolic and cardiovascular disease: role of osteocalcin. *Osteoporos Int* 2017; 28(8):2265-73.
 28. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8:457-65.
 29. Mera P, Laue K, We J, Berger JM, Karsenty G. Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice. *Mol Metab* 2016; 5:1042-7.
 30. Mera P, Laue K, Ferron M, et al. Osteocalcin signaling in myofibers is necessary and sufficient for optimum adaptation to exercise. *Cell Metab* 2016; 23:1078-92.
 31. Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:5817-21.
 32. Karsenty G. Update on the biology of osteocalcin. *Endocr Pract* 2017; 23:1270-4.
 33. Karsenty G, Oury F. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382:521-6.
 34. Oury F, Ferron M, Huizhen W, et al. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest* 2013; 123:2421-33.
 35. Oury F. A crosstalk between bone and gonads. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1260:1-7.
 36. Hannemann A, Breer S, Wallaschofski H, et al. Osteocalcin is associated with testosterone in the general population and selected patients with bone disorders. *Andrology* 2013; 1:469-74.
 37. Kirmani S, Atkinson EJ, Melton LJ, Riggs BL, Amin S, Khosla S. Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *J Bone Miner Res* 2011; 26:2212-6.
 38. Paduch DA. Testicular cancer and male infertility. *Curr Opin Urol* 2006; 16:419-27.
 39. Oury F, Khrimian L, Denny CA, et al. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell* 2013; 155:228-41.
 40. Khrimian L, Obri A, Ramos-Brossier M, et al. Gpr158 mediates osteocalcin's regulation of cognition. *J Exp Med* 2017; 214(10):2859-73.
 41. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 2016; 82:42-9.
 42. Rousseaud A, Moriceau S, Ramos-Brossier M, Oury F. Bone-brain crosstalk and potential associated diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2016; 28:69-83.
 43. Luckhaus C, Mahabadi B, Grass-Kapanke B, et al. Blood biomarkers of osteoporosis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2009; 116:905-11.
 44. Zhou R, Zhou H, Rui L, Xu J. Bone loss and osteoporosis are associated with conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2014; 11:706-13.
 45. Khrimian L, Obri A, Karsenty G. Modulation of cognition and anxiety-like behavior by bone remodeling. *Mol Metab* 2017; 6:16105.