

## ACTUALIZACIONES / Reviews

# REMODELAMIENTO ÓSEO: CONTROL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y ROL DE LA LEPTINA

Susana Zeni

Profesora Adjunta, Cátedra de Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. Investigadora independiente del CONICET.

### Resumen

El esqueleto continuamente remodela en una acción coordinada de osteoblastos y osteoclastos. El mantenimiento de la integridad mecánica y homeostasis mineral requiere un delicado equilibrio entre la formación y resorción ósea ya que un desbalance entre ambas llevaría a una debilidad ósea con el incremento en el riesgo de fracturas por fragilidad. La actividad de osteoblastos y osteoclastos está regulada por varias hormonas sistémicas y también localmente por factores producidos por las mismas células óseas o células vecinas. Estos factores, citoquinas y prostaglandinas, están a su vez regulados en parte por hormonas sistémicas. Recientemente se ha sugerido que el remodelamiento óseo, como la mayoría de las funciones homeostáticas, también se encontraría regulado por el sistema nervioso central (SNC) a través de conexiones nerviosas eferentes. Las células óseas presentan receptores funcionantes para una serie de factores neuropeptídicos que se cree son moléculas señalizadoras de los mensajes del SNC. Una serie de eventos sugieren que una hormona que regula el apetito, la reproducción y el consumo de energía a través de receptores específicos hipotalámicos estaría también implicada en el control del remodelamiento óseo. Este hecho determina una vinculación directa entre el metabolismo energético y óseo. La leptina es una hormona producida principalmente, pero no exclusiva-

mente por la grasa blanca, es transportada unida a receptores específicos y atraviesa la barrera hematoencefálica y se une a receptores hipotalámicos desencadenando una serie de procesos. Uno de ellos corresponde a la activación del sistema nervioso simpático, el cual estaría implicado en el control del remodelamiento óseo. A nivel de la formación la leptina actúa sobre receptores beta2adrenérgicos desencadenando una acción antiosteogénica. A nivel de la resorción y sobre el mismo tipo de receptores presenta una acción osteoclastogénica. Sin embargo, el mecanismo central implicado es diferente. Por otra parte los osteoblastos, en una clásica regulación de tipo *feedback* negativo, controlan el metabolismo energético. La sustancia "hormonal" encargada de dicho proceso sería la osteocalcina no carboxilada.

**Palabras clave:** remodelación ósea, citoquinas, hormonas, leptina, sistema nervioso central, sistema nervioso simpático, osteoblastos, osteoclastos.

### Summary

### **BONE REMODELING: CENTRAL NERVOUS SYSTEM CONTROL AND ROL OF LEPTIN**

*The skeleton is constantly being remodeled by the coordinated action of osteoblasts and osteoclasts. A delicate equilibrium between*



*bone formation and resorption is needed to maintain mineral homeostasis and biomechanical integrity. The activity of bone cells is regulated by systemic hormones and also by local factors, produced by these cells. Such factors, cytokines and prostaglandins, are in turn partially regulated by systemic hormones. It has recently been suggested that bone remodeling, like other homeostatic functions, is under the control of the central nervous system (CNS) through efferent pathways. Bone cells have receptors for several neuropeptides that are thought to mediate control by the CNS. Several findings indicate that a hormone regulating appetite, energy consumption, and reproduction is also implicated in the regulation of bone remodeling. This could represent a link between calorogenesis and mineral metabolism. Leptin is a hormone produced predominantly, but not exclusively, by white fat; it is transported bound to specific receptors, goes through the blood-brain barrier and binds to hypothalamic receptors. One of the consequences is the activation of the sympathetic nervous system, which could be involved in the control of bone remodeling. Leptin, acting via beta2adrenergic receptors in osteoblasts, is antiosteogenic. At the same time, and acting through the same receptors in the osteoclasts, it is osteoclastogenic. However, the central regulating mechanism is different. On the other hand, osteoblasts control energy balance through a negative feedback loop. The "hormone" implicated in this process could well be decarboxylated osteocalcin.*

**Key words:** *bone remodeling, cytokines, hormones, leptin, central nervous system, sympathetic nervous system, osteoblasts, osteoclasts.*

## Introducción

El esqueleto es un tejido dinámico que cons-

tantemente se renueva por medio del proceso de remodelamiento óseo llevado a cabo por la acción coordinada de osteoblastos y osteoclastos, a través de dos fases interconectadas entre sí: resorción de hueso viejo y formación de hueso nuevo. El mantenimiento de la integridad mecánica y homeostasis mineral requiere de un delicado equilibrio entre estas dos fases, ya que un desequilibrio entre ambas llevará indefectiblemente a debilidad ósea con aumento en el riesgo de fracturas por fragilidad.<sup>1</sup>

La actividad de las células óseas está regulada por varias hormonas sistémicas y factores locales producidos por las células óseas u otras células que se encuentran en la vecindad. Dichos factores autocrinos y paracrinos incluyen citoquinas, factores de crecimiento y prostaglandinas.

Estudios recientes evidenciaron que las células óseas presentan receptores funcionales para una serie de neuropéptidos, lo que llevó a postular que moléculas señalizadoras del sistema nervioso central (SNC) podrían participar en el control del metabolismo óseo a través de conexiones nerviosas eferentes.

La serie de eventos que llevaron a comprobar la regulación del SNC y que incluyeron estudios en animales genéticamente modificados, farmacológicos experimentales y la búsqueda de su correlato en cierto tipo de patologías humanas, surgieron a la luz luego del descubrimiento en 1994 de la leptina.<sup>2</sup> Esta hormona pleiotrópica, producto del gen *Ob* es secretada principalmente –pero no exclusivamente– por el tejido adiposo blanco; su concentración plasmática se correlaciona con la masa corporal grasa y regula el apetito, la reproducción y el consumo de energía mediante un mecanismo de *feedback* negativo a través de receptores hipotalámicos específicos, desencadenando la activación del SNS.<sup>1</sup>

A pesar de que los ratones deficientes en leptina (*ob/ob*) son obesos e hipogonádicos,<sup>2</sup> su masa esquelética se encuentra aumentada, producto de un masivo aumento en los pará-

metros de formación ósea.<sup>3</sup> Los ratones genéticamente modificados que carecen del receptor en hipotálamo (db/db) presentan una masa ósea aumentada, similar a la que se observa en los ratones ob/ob deficientes en leptina. Estos hallazgos sugirieron que la falta de señal de leptina aumentaría pronunciadamente la formación ósea. Su correlato en humanos se evidencia en niños lipodistróficos y deficientes en leptina los cuales presentan una edad ósea avanzada.

Si bien los osteoblastos expresan receptores para la leptina, el efecto inhibitorio de dicha hormona sobre la formación ósea se produce mediante la vía central.<sup>4</sup> La forma larga del receptor de leptina (Ob-Rb), encargado de transducción de señales, se encuentra con una concentración máxima en los 3 núcleos hipotalámicos: arcuato, ventromedial (VM) y paraventricular.<sup>5,6</sup> Mediante la acción de sustancias químicas es posible la destrucción específica de un determinado núcleo hipotalámico. La droga orotoglucosa (OTG) destruye específicamente el núcleo VMH. Cuando los animales salvajes se tratan con OTG se produce un aumento de la masa ósea sin afectar el apetito. La inyección icv de la hormona no revierte el aumento en la masa ósea; sin embargo, continúan respondiendo a los efectos anorexígenos de la leptina. Todos estos hallazgos sugieren que:

1. la regulación de la masa ósea por leptina ocurre a través del SNC por una vía distinta a la regulación gonadal y del apetito;<sup>4</sup>
2. Las neuronas del VMH se encuentran implicadas en el control central de la masa ósea por leptina.

Entre las acciones que presenta la leptina a nivel central se encuentra la regulación de la descarga simpática actuando como un agonista beta-adrenérgico. Diversas observaciones llevaron a postular que la leptina controla la actividad osteoblástica mediante una señal beta- adrenérgica:

1) Los ratones ob/ob presentan un tono simpático disminuido;<sup>7</sup>

2) La inyección de leptina directamente en el HVM activa la vía simpática e incrementa la producción de los dos mediadores del sistema nervioso simpático (SNS), adrenalina (A) y noradrenalina (NA);

3) Los osteoblastos presentan receptores neuropéptidicos alfa y beta adrenérgicos;<sup>1</sup>

4) Los osteoblastos primarios expresan receptores beta2-adrenérgicos (beta2AR) funcionales y ningún otro receptor adrenérgico postsináptico, sugiriendo que dichas células son receptoras *in vivo* al tono simpático.<sup>8</sup>

En la síntesis de norepinefrina y epinefrina [Tir-Dopa-Dopamina-DBH-Norepinefrina] se encuentra involucrada una enzima, la dopamina beta-hidroxilasa (DBH).<sup>8</sup> Ratones deficientes en DBH, a pesar de que tienen un aumento pronunciado de dopamina y corticosterona, presentan una masa ósea aumentada respecto de los controles.<sup>9</sup> Por otra parte, ratones deficientes en beta2AR tienen peso corporal normal, *status* hormonal normal y un incremento tanto del volumen óseo trabecular como de su masa ósea. En ellos, la infusión icv de leptina no induce la disminución de la masa ósea, y son resistentes a la pérdida ósea post-ovariectomía.<sup>9</sup> Finalmente, el bloqueo de los beta2AR protege a los ratones ob/ob de la pérdida de masa ósea por la icv de leptina. Estudios farmacológicos en animales salvajes demostraron que el bloqueo de los receptores beta2AR con un antagonista no selectivo como el propanolol incrementa la masa ósea. Contrariamente, el tratamiento con un agonista no selectivo como el isoproterenol disminuye la masa ósea.<sup>8,10</sup>

Una serie de evidencias indica también en humanos el rol del SNS en la biología ósea mediante dicha señal beta-adrenérgica. En este sentido, la distrofia simpática refleja caracterizada por el aumento localizado del tono simpático y baja masa ósea puede mejorarse por el tratamiento con beta-bloqueantes. Asimismo, existen estudios prospectivos que determinan la reducción en el riesgo de



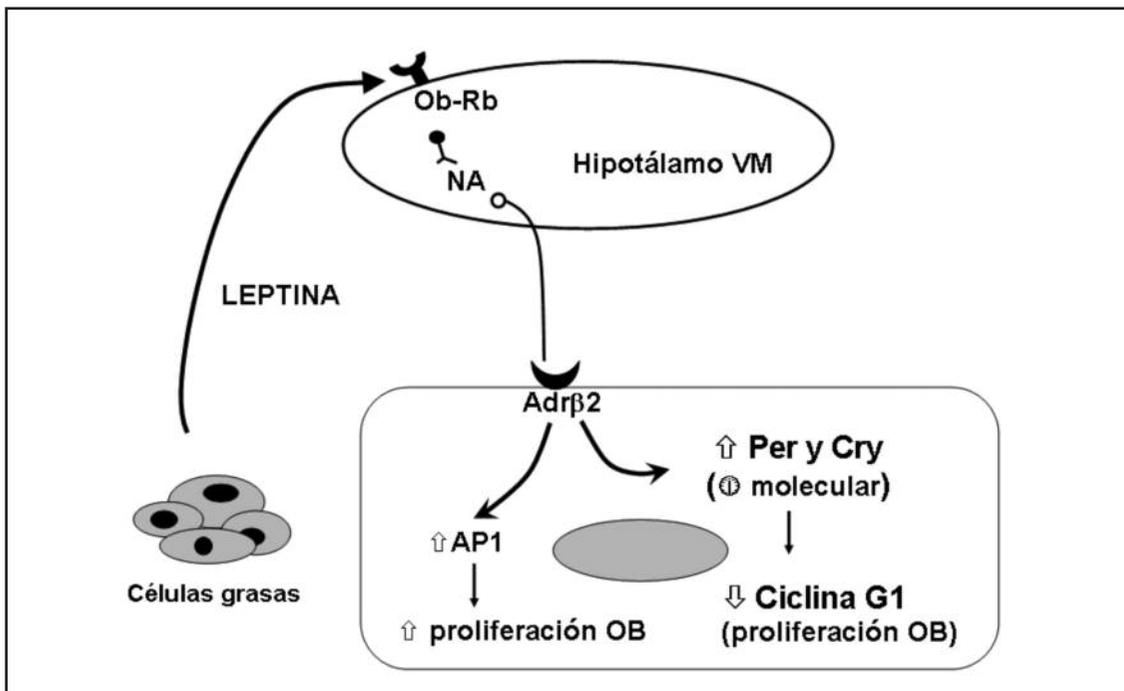
fracturas e incremento en la DMO en los individuos tratados con beta-bloqueantes.<sup>11,12</sup> Un meta-análisis sobre riesgo de fracturas en pacientes que fueron tratados con tales drogas encontró que su uso se encontraba asociado con la reducción del 28% en el riesgo de fracturas de cadera y con un 14% en fracturas de otro tipo,<sup>13</sup> mientras que el uso de alfa- bloqueantes no tenía efectos.

En conclusión, las neuronas centrales respondedoras a leptina presentes en la zona VMH inhibirían la formación ósea vía la señal mediada por beta2AR sin la existencia de ningún otro mediador adicional.<sup>8</sup>

El mecanismo celular antiosteogénico induci-

do por leptina no incluye la apoptosis sino la inhibición de la proliferación y funcionalidad de los osteoblastos. El mecanismo molecular de la señal beta-adrenérgica en osteoblastos puede ser entendida si se tiene en cuenta que el remodelamiento óseo presenta un rol homeostático y, como tal, un ritmo diario. Los osteoblastos expresan genes circadianos periféricos como *Per* y *Cry* que forman parte del reloj molecular y que están regulados por el SNS. Estos genes controlan a su vez la inhibición simpática en la formación ósea dependiente de leptina suprimiendo la expresión de las ciclinas G1 responsables de la proliferación de los osteoblastos (Figura 1).<sup>1</sup>

Figura 1



Sin embargo, la señal simpática dependiente de leptina ejerce efecto compensatorio por el cual se estimula la actividad proliferativa osteoblástica mediante la acción del factor transcripcional AP-1.

#### Efecto de la leptina sobre la resorción ósea

Los ratones deficientes en beta2AR, además de la masa ósea aumentada, presentan una

resorción ósea disminuida por un defecto en la osteoclastogénesis. Este hecho sugiere que también en la otra rama del remodelamiento óseo existiría una acción del SNC y posiblemente se encuentren implicados en ello centros hipotalámicos.

Al igual que los osteoblastos, los osteoclastos expresan receptores adrenérgicos.<sup>14</sup> Sin embargo, el efecto del SNS sobre la osteo-

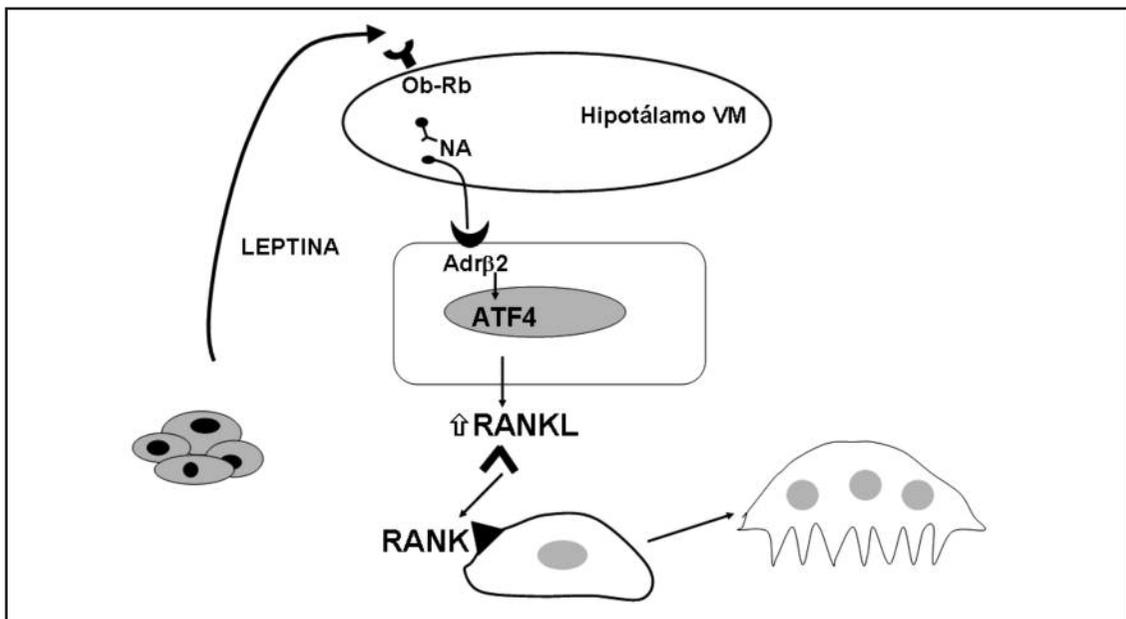
clastogénesis es indirecta y mediada por los osteoblastos vía sus beta2AR a través de los cuales se estimula la expresión de RANKL.<sup>9</sup> Por otra parte, el aumento notable en la formación ósea que presentan los ratones ob/ob se acompaña de un leve incremento en la resorción ósea.<sup>3,15</sup> Los ratones ob/ob se diferencian de aquéllos deficientes en beta2AR no sólo por la presencia de obesidad sino también por la disminución en la expresión del neuropéptido hipotalámico CART.<sup>16</sup> Este neuropéptido está ligado a receptores de pro-opio-melanocortina (POMC), son activados por leptina y su función es regular la expresión de RANKL. El mecanismo molecular de acción del CART aún no está totalmente dilucidado, si bien el resultado final es el aumento de la osteoclastogénesis. Ratones eugonádicos deficientes en CART expresan más altos niveles de

RANKL que los salvajes y por lo tanto mayor osteoclastogénesis y resorción ósea. Los pacientes con mutaciones inactivantes del Mcr4 tienen mayores niveles circulantes de CART y mayor resorción ósea.<sup>9,17</sup>

Según lo ya expuesto, la señal de leptina regula la resorción ósea por dos caminos antagónicos. El primero de ellos estimula la resorción a través del SNS incrementando la expresión de RANKL por osteoblastos. El segundo reduce la resorción ósea por intermedio de CART el cual disminuye la expresión de RANKL también por osteoblastos.<sup>9</sup>

En conclusión, la osteoclastogénesis y la resorción ósea estarían bajo el control de mediadores neuronales, como ocurre con la formación ósea, en forma indirecta a través de los osteoblastos y la expresión de RANKL (Figura 2).

Figura 2



### REGULACION DEL METABOLISMO ENERGETICO POR OSTEOCALCINA

En general, las funciones hormonales presentan regulaciones de naturaleza retroalimentada. Por ello se ha propuesto que si la proliferación y actividad de los osteoblastos está

controlada por una hormona generada por el tejido graso, posiblemente estas células osteogénicas puedan ejercer una clásica regulación de tipo *feedback* negativo sobre los adipocitos.<sup>18</sup>

Para ello fue necesario buscar moléculas



específicamente secretadas por el osteoblasto que regulen hormonalmente *in vivo* el metabolismo energético. Afortunadamente, excluyendo a los genes que codifican factores transcripcionales, el osteoblasto presenta escasos genes específicos. El primer gen estudiado fue el *Esp* que codifica a una proteína señalizadora transmembrana denominada tirosina fosfatasa osteotesticular (OST-PTP), cuyo nombre proviene de su presencia en *stem cells* embrionarias, células de Sertoli y osteoblastos.

La expresión de *Esp* induce directamente la diferenciación osteoblástica *in vitro* pero su delección en ratones transgénicos no produce ninguna anomalía esquelética. Animales *Esp*<sup>-/-</sup> presentan anomalías, independientemente del género, todas ellas relacionadas a la regulación del metabolismo de la glucosa:<sup>19</sup>

- incremento en la secreción de insulina;<sup>18</sup>
- hipoglucemia;
- incremento en la proliferación de células beta del páncreas, lo que genera un aumento en la masa celular y en el tamaño del islote;<sup>20</sup>
- aumento periférico en la sensibilidad a la insulina, debido a un aumento en la secreción de adiponectina por las células grasas;
- disminución en la masa grasa, por lo cual los animales permanecen delgados con la edad;
- disminución de los triglicéridos (TGL).<sup>21</sup>

Contrariamente animales que sobreexpresan el gen *Esp* únicamente en osteoblastos (ratones alfa1(I)colágeno-*Esp*) presentan intolerancia a la glucosa (diabetes tipo 2), reducción en la secreción y sensibilidad a la insulina, junto a una masa grasa incrementada. Estos datos sugieren que posiblemente el osteoblasto se comporte como una célula endocrina controlando el metabolismo energético mediante la liberación de una o varias hormonas, regulada por OST-PTP.<sup>22</sup> Dichas hormonas serían las responsables de aumentar la expresión de insulina por la células beta del páncreas y de inducir la expresión del gen de adiponectina en

los adipocitos.<sup>23</sup>

Para identificar a dicha hormona se estudió al gen que codifica a la osteocalcina (BGP), molécula secretada exclusivamente por los osteoblastos.<sup>3</sup> La BGP presenta tres residuos de ácido glutámico (glu) al que modificaciones postraslacionales dependientes de vitamina K lo gama-carboxilan, dando carboxiglutámico (gla). Estos residuos son los responsables de la alta afinidad de la BGP por el calcio de la hidroxapatita ósea.<sup>24</sup> La BGP fue identificada hace más de 30 años como un componente de la matriz extracelular del hueso que se une con alta especificidad a la hidroxapatita; sin embargo, también se encuentra en circulación donde puede evaluarse bioquímicamente. Si bien es la proteína no colágena más abundante en el tejido óseo,<sup>25</sup> no participaba en el proceso de mineralización del espacio extracelular, ya que, sorprendentemente, ratones que carecen del gen de *Ocn* (-/-) tienen su formación ósea aumentada respecto de los animales salvajes. La BGP presenta cierto comportamiento hormonal:

1. está codificada por un gen celular específico;<sup>3</sup>
2. es generada como una pre-promolécula que luego de su ruptura intracelular específica se vuelca en forma madura a circulación;
3. su secreción presenta un ritmo circadiano.

Como el tratamiento de pacientes con cumarina, droga que inhibe la carboxilación de la BGP, provoca disminución de la glucosa sanguínea, se sugirió que dicho compuesto podría ser aquella hormona que regula el metabolismo energético. Sin embargo, por lo menos hasta el momento no se ha encontrado un receptor específico para BGP, aunque esto ocurrió también con varias hormonas al ser descubiertas como tal, por ejemplo la insulina.

El ratón *Ocn*<sup>-/-</sup> presenta el fenotipo metabólico en espejo respecto del ratón *Esp*<sup>-/-</sup>. Esto llevó a postular que el ratón *Esp*<sup>-/-</sup> constituye un modelo de ratón con "bioactividad" incrementada de BGP, y que los genes que codifican a la

BGP y al OST-PTP provienen de la misma vía regulatoria, conectando así al metabolismo energético con el metabolismo óseo.<sup>23</sup>

La carboxilación, como ocurre con los factores de la coagulación, ofrece un medio para regular la bioactividad de las proteínas conteniendo residuos de gla. Ratones *Esp*<sup>-/-</sup> presentan niveles circulantes de BGP no carboxilada 26% mayores que los animales salvajes.<sup>26</sup> Si a estos animales se les bloquea la carboxilación por warfarina, la fracción de BGP no carboxilada se incrementa e induce mayor expresión de adiponectina en adipocitos. Si bien los estudios que demostraron estos resultados son rudimentarios, confirman que, al menos en ratones, los osteoblastos se comportan como células endocrinas que actúan sobre el metabolismo energético mediante la BGP no carboxilada. El producto del gen *Esp*, o sea el OST-PTP, favorecería la carboxilación de la BGP disminuyendo su bioactividad. Sin embargo, una pequeña fracción de BGP no carboxilada se volcaría a circulación y actuaría sobre páncreas y adipocitos estimulando la expresión de genes que codifican a la adiponectina e insulina, respectivamente, mejorando así la captación de glucosa.

La acción de la BGP no carboxilada sobre el metabolismo energético fue comprobada *in*

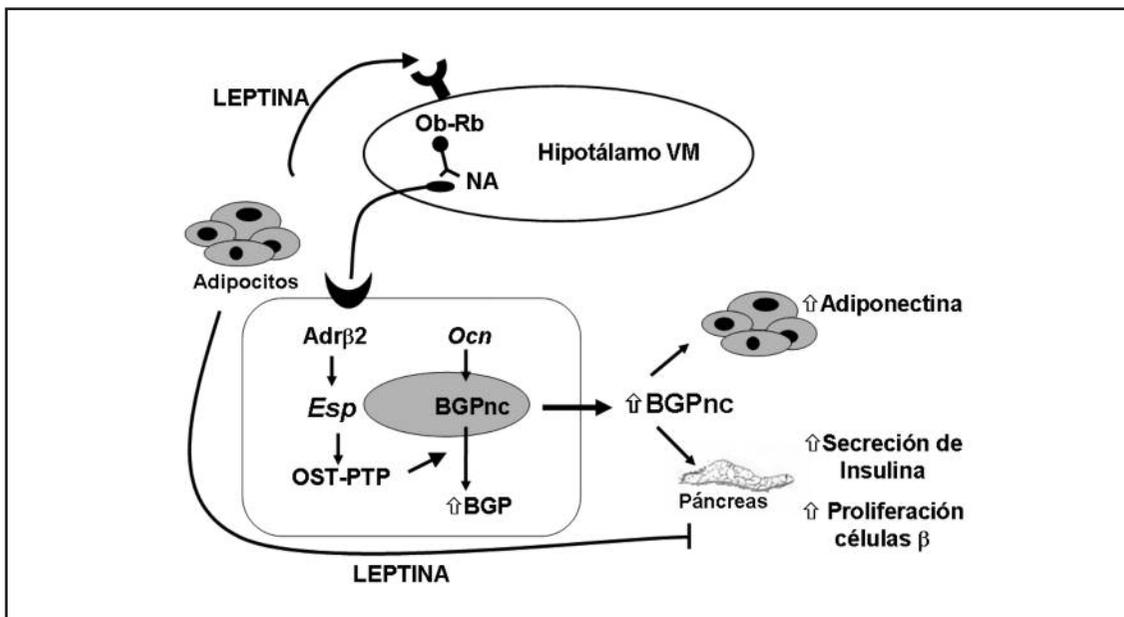
*vitro* e *in vivo* mediante el uso de BGP no carboxilada recombinante y su correlato en humanos ha sido demostrado recientemente.<sup>27</sup>

La acción de la leptina sobre la BGP no carboxilada fue confirmada en ratones transgénicos *ob/ob*.<sup>28</sup> En ellos, la falta de leptina circulante induce directamente la secreción de insulina por las células beta del páncreas. Por otra parte el tono simpático disminuido inhibe la producción de OST-PTP reduciendo la producción y carboxilación de BGP por los osteoblastos. Esta falta de BGP no carboxilada disminuye la secreción de adiponectina, lo cual a su vez disminuye la resistencia a la insulina llevando a hiperglucemia.

En conclusión: el tono simpático favorece la expresión del gen *Esp* por los osteoblastos, el que estimula, a través de OST-PTP, la carboxilación de BGP e inhibe su bioactividad. Una porción de la BGP no carboxilada se vuelca a circulación y desde allí ejerce sus funciones en adipocitos y células beta del páncreas, regulando el metabolismo de la glucosa. La leptina regularía la secreción de insulina disminuyendo la bioactividad de la BGP (Figura 3).

(Recibido y Aceptado: agosto de 2009)

Figura 3





## Referencias

1. Elefteriou F. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473:231-6.
2. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-32.
3. Ducy P, Amling M, Takeda S, *et al.* Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000; 100:197-207.
4. Ahima RS. Body fat, leptin, and hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 2004; 351: 959-62.
5. Elmquist JK, Bjørbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 1998; 395:535-47.
6. Bjørbaek C, Elmquist JK, Michl P, *et al.* Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 1998; 139:3485-91.
7. Young JB, Fish S, Landsberg L. Sympathetic nervous system and adrenal medullary responses to ischemic injury in mice. *Am J Physiol* 1983; 245:E67-E73.
8. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, *et al.* Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002; 111:305-17.
9. Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, *et al.* Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005; 434:514-20.
10. Bonnet N, Brunet-Imbault B, *et al.* Alteration of trabecular bone under chronic beta2 agonists treatment. *Med Sci Sports Exerc* 2005; 37:1493-501.
11. Turker S, Karatosun V, Gunal I. Beta-blockers increase bone mineral density. *Clin Orthop Relat Res* 2006; 443:73-4.
12. Meisinger C, Heier M, Lang O, Doring A. Beta-blocker use and risk of fractures in men and women from the general population: the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Osteoporos Int* 2007; 18:1189-95.
13. Wiens M, Etmann M, Gill SS, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med* 2006; 260:350-62.
14. Arai M, Nagasawa T, Koshihara Y, Yamamoto S, Togari A. Effects of beta-adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1640:137-42.
15. Hamrick MW, Pennington C, Newton D, Xie D, Isaacs C. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone* 2004; 34:376-83.
16. Kristensen P, Judge ME, Thim L, *et al.* Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998; 393:72-6.
17. Ahn JD, Dubern B, Lubrano-Berthelier C, Clement K, Karsenty G. Cart overexpression is the only identifiable cause of high bone mass in melanocortin 4 receptor deficiency. *Endocrinology* 2006; 147:3196-202.
18. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130:456-69.
19. Mauro, L.J. Olmsted EA, Skrobacz BM, Mourey RJ, Davis AR, Dixon JE. Identification of a hormonally regulated protein tyrosine phosphatase associated with bone and testicular differentiation. *J Biol Chem* 1994; 269:30659-67.
20. Confavreux CB, Levine RL, Karsenty G. A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 310:21-9.
21. Lowel BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404:652-60.
22. Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:161-6.

23. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7:941-6.
24. Price PA. Gla-containing proteins of bone. *Connect Tissue Res* 1989; 21:51-7.
25. Ducy P, Desbois C, Boyce B, *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382:448-52.
26. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130:456-69.
27. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:827-32.
28. Kalra SP, Dube MG, Iwaniec UT. Leptin increases osteoblast-specific osteocalcin release through a hypothalamic relay. *Peptides* 2009; 30:967-73.