# 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.

São Paulo 2018

## 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 integral

São Paulo 2018

#### CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cipriano Guedes, José Augusto A osteocalcina melhora a resistência à insulina e a inflamação em camundongos obesos: participação do figado, tecido adiposo branco e osso. / José Augusto Cipriano Guedes; orientador Daniela Tomie Furuya. -- São Paulo, 2018. 89 p. Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Osteocalcina.. 2. Resistência à insulina. 3. Inflamação. 4. Obesidade. 5. GLUT4. I. Tomie Furuya, Daniela, orientador. II. Titulo. Candidato(a): José Augusto Cipriano Guedes

Título da Dissertação/Tese: A osteocalcina melhora a resistência à insulina e a inflamação em camundongos obesos: participação do fígado, tecido adiposo branco e osso.

Orientador: Dra. Daniela Tomie Furuya

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ............, considerou o(a) candidato(a):

(	) Aprovado(a)	()	Reprovado(a)
<b>١</b>	//		

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone dS5) (011) 3091,7733 - e-mail: cep@ich.usp.ltr

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 131 nas fls. 25 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Daniela Tomie Furuya, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Regulação do metabolismo da glicose pelo osso: ações da osteocalcina na resistência à insulina e inflamação em tecidos adiposo e hepático" do qual participam o(s) aluno(s) Aline Yamamoto, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 02.02.2015, com validade de 4 anos.

São Paulo, 04 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE

Secretária- CEUA - ICB/USP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIONÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Golda Universitia 'Amarto de Sales Olives 2', Notesta, Ede Paulo, 5P de Pretexes Lano Pretex. 2415 - CB H - 05505 500 CEUA-ICE/USP - Telefone (11) 3081-7733 - a mail ceptigeto val te

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto initiulado "Ação do estecención sobre o metabolismo de giócose e inflamação em adiales musculares e em tecido muscular esquritêtico de comunidangos obesos", registrado sob o protocolo nº 2/2016, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertenciones ao filo Chordata, subilio Vertebrata (esceto o homent), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os procetos de Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2005, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas estuadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animai (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado om 18/03/2016 pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS de Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de 04 (quatro) anos a partir da data de aprovação.

-Investigador Principal: Dr.(a.) Ubiratan Fabres Machado

Departamento: Fisiplogia e Siofísica

 Membros da Equipe: José Augusto Cipriono Buedes (Pás-graduando), Danielo Tomie Funiya (Jovem pesquisador) Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta date uma nova proposta deverá ser

CEUA-ICE/USP até o utimo dia de valdade da atual proposta. Apos esta date uma nova proposta acerca a encaminhada.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "Role of osteocolch in glucase metabolism and information in muscle cells and skeletal muscle of obese mice", protocol st 2/2016, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purpose, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree st 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 3/18/2016 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USL Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CELM-ICB/USP), and the Romes for animal use is walld for 04 (four) years from the date of approval. -Principal Investigator: Dr.(a.) Urbinaton Fabrics Machado

 Team members: José Augusto Cipriano Guedes (Groduate Student), Daniela Tamie Furuya (Young Investigator) If a ranewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Ago-Weight	Total
Mus musculus	(0)	Macha/Male	I shk/day	50
A	wes		Silo Paulo, 22 di	e março de 201
Prof. Dr. An Coordenad	derson de Så Nunes Ier CEUA-ICB/USP	Pr	of, Dr. transamilition Goulart Vice-Secretário CEU4-ICBA	da Silva JSP

Dedico este trabalho à minha avó Tarcila, à minha mãe Julieta e ao meu pai Dermeval.

#### AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que por sua imensa bondade tem sempre misericórdia de mim e me mantém firme e forte nas dificuldades da vida.

Agradeço imensamente à minha avó Tarcila e aos meus pais que sempre se preocuparam com o meu bem estar, principalmente espiritual, e que foram as principais pessoas que permitiram que eu me tornasse quem eu sou atualmente, pois foi por eles que tive toda a ajuda e suporte em tudo o que precisei ao longo da minha vida.

À cada um dos meus familiares, irmãos, tios, tias, primos, primas, alguns acompanhando bem de perto a minha trajetória acadêmica e sempre me apoiando como podiam.

Aos diversos professores e amigos que estiveram comigo na minha jornada acadêmica.

Ao professor Ubiratan Fabres Machado por me receber em seu laboratório e auxiliar na realização do presente projeto.

À minha orientadora Dra. Daniela Tomie Furuya, que me recebeu inicialmente como aluno de iniciação científica, e ao longo do percurso me ensinou muitas coisas sempre com paciência e amizade, dando suporte e aconselhando tanto para a vida acadêmica quanto para a vida pessoal.

Às técnicas do laboratório de metabolismo e endocrinologia, Maristela Mitiko Okamoto e Helayne Soares de Freitas, pelo companheirismo e pelas diversas formas de contribuição para a realização do presente projeto.

Aos colegas de laboratório Ana Barbara, Aline, Caio, Danilo, Frederico, Larissa, Luciana Alves, Luciana Tocci, Patrícia, Michele e Raquel, e de forma muito especial, Bruna, Erika, João Victor e Maria Luiza, por todo apoio que recebi, seja para a realização dos experimentos, para as discussões acadêmicas ou para a vida pessoal.

Ao meu amigo de bancada, de percurso acadêmico e da vida, João N. B. Andrade, que esteve ao meu lado em diversos momentos e experimentos, sempre me apoiando com muita paciência no que eu precisei, sendo que me faltam palavras para agradecer por tudo o que ele me proporcionou viver neste curto tempo de amizade que temos.

Aos mais diversos amigos, seja da vida acadêmica ou da vida pessoal, em especial ao Gabriel França, e ao meu melhor amigo Danilo Dias, o qual me possibilitou viver ocasiões que mudaram totalmente a minha visão de mundo neste período do mestrado.

A todos amigos, funcionários e professores do Instituto de Ciências Biomédicas e da Universidade de São Paulo que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação e para a realização do presente projeto. Às agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos financiamentos da bolsa de estudo e do projeto desenvolvido.

E por fim agradeço imensamente aos animais que foram sacrificados para a realização do presente estudo, uma vez que a contribuição destes foi com o bem mais precioso que temos, a vida.

"Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos."

Albert Einstein

#### **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-a. 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 periepididimal, 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-a, 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 l. Dissertation (Master of Science (Human Physiology)) –Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

The discovery of osteocalcin, a protein synthetized 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 collect for biochemical/metabolic profile analysis; and, liver, skeletal muscle, white adipose tissue(WAT) and bone were collected for protein (Western blotting) and mRNA (RTqPCR) 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 inflammassome 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-a 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.

### LISTA DE ABREVIATURAS

Actb	gene que codifica a beta-actina
Adipoq	gene que codifica a adiponectina
AGEs	produtos de glicação avançada
BCRJ	banco de cultura de células do Rio de Janeiro
Bglap	gene que codifica a osteocalcina
Bglap <sup>-/-</sup>	animais knockout para o gene Bglap
BSA	albumina bovina sérica
С	grupo de animais controle
Casp1	gene que codifica a caspase 1
Ccl2	gene que codifica proteína quimiotática de monócitos 1
Cptla	gene que codifica a carnitina palmitoil transferase
Dgat1	gene que codifica a diacilglicerol O-aciltransferase 1
DHGNA	esteatose hepática ou doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	diabetes <i>mellitus</i> do tipo II
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	erro padrão médio
Esp	gene da proteína tirosina fosfatase osteotesticular
$Esp^{-/-}$	animais knockout para o gene Esp
Gapdh	gene que codifica a proteína Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
GéPase	glicose-6-fosfatase
<i>G6pc</i>	gene que codifica a glicose-6-fosfatase
Ggcx	gene da enzima $\gamma$ -glutamilcarboxilase
GLUT2	Isoforma 2 do transportador de glicose
GLUT4	Isoforma 4 do transportador de glicose
<i>Gprc6a</i>	gene que codifica o receptor GPRC6A
i.p.	intraperitonial
IL-1 beta	interleucinas 1 beta
Illb	gene que codifica a interleucina 1 beta
116	gene que codifica a interleucina 6
IL-6	interleucina 6
ITT	teste de tolerância à insulina
Kitt	constante de decaimento de glicose
MCP1	proteína quimiotática de monócitos 1
MSG	glutamato monossódico
NFKB	fator nuclear kappa B
Nfkb1	gene que codifica a proteína p65
Ňlrp3	gene que codifica a NACHT
OB	grupo de animais obeso não tratados
OB-OC	grupo de animais obeso tratados com osteocalcina não carboxilada
OST-PTP	tirosina fosfatase osteotesticular
Pck1	gene que codifica a proteína PEPCK-C
PCR	reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição
-	reversa
PEPCK-C	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
Ptprv	gene que codifica a proteína tirosina fosfatase osteotesticular
RE	retículo endoplasmático
Rela	gene que codifica a proteína p50
Rplp0	gene que codifica a proteína ácida ribossomal 60S P0

SFB	soro fetal bovino
Slc2a2	gene que codifica a proteína GLUT2
Slc2a4	gene que codifica a proteína GLUT4
SREBP-1C	proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol
Srepb isoforma c	gene que codifica a proteína SREBP-1C
TAB	tecido adiposo branco
Tnfa	gene que codifica a proteína TNF-a
TNF-a	fator de necrose tumoral
UA	unidade arbitrária

1	IN	TRODUÇÃO	16
	1.1	A formação de osteocalcina	16
	1.2	Regulação do metabolismo de glicose pela osteocalcina	18
	1.3	Evidências clínicas e terapêuticas de ação da osteocalcina	19
	1.4	Obesidade, resistência à insulina e inflamação	20
2	OE	BJETIVO	22
	2.1	Objetivos específicos	22
3	M	ATERIAL E MÉTODO	24
	3.1	Células	24
	3.1	.1 Cultivo e Tratamento	24
	3.2	Animais	25
	3.2	2.1 Níveis plasmáticos de glicose, frutosamina, insulina e triglicérides	26
	3.3	Extração de RNA	26
	3.4	RT-qPCR – PCR em tempo real	27
	3.5	Extração proteica e Western blotting	28
4	RF	ESULTADOS	30
	4.1	Variáveis Morfométricas	30
	4.2	Consumo de ração e água	31
	4.3 carbo	Concentrações plasmáticas de glicose, frutosamina, insulina, osteocalcina i oxilada e triglicérides	1ão 31
	4.4	Teste de tolerância à insulina <i>in vivo</i>	32
	4.5	Teste de tolerância ao piruvato <i>in vivo</i>	33
	4.6	Músculo Esquelético Gastrocnêmio	34
	4.6	6.1 Conteúdo de mRNA de Slc2a4 e de proteína GLUT4	34
	4.7	Fígado	35
	4.7	7.1 Conteúdo de mRNA de Slc2a2, e de proteína GLUT2	35
	4.7	2.2 Conteúdo de mRNA de genes relacionados com lipogênese e lipólise	36
	4.7	2.3 Conteúdo de mRNA de genes relacionados com gliconeogênese	36
	4.7	.4 Conteúdo de mRNA de gene relacionado com inflamação	36
	4.7	2.5 Sinalização Insulínica	
	4.7	.6 Densidade volumétrica de gordura no fígado	39
	4.8	Tecido Adiposo Periepididimal	40
	4.8	2.1 Conteúdo de mRNA de Adipoq, Slc2a4 e de proteína GLUT4	40
	4.8	2.2 Sinalização insulínica	42
	4.8	2.3 Conteúdo de mRNA de Tnfa, Ccl2, Il1, Il6, Nlrp3 e Casp1	43
	<i>4.8</i>	2.4 Análise histológica	45

# SUMÁRIO

4.9 Adipócitos 3T3-L1	46
4.9.1 Conteúdo de mRNA de Slc2a4 e de Proteína GLUT4	46
4.9.2 Conteúdo de mRNA de Tnfa, Ccl2, Nfkb1 e Rela	49
4.10 Fêmur	51
4.10.1 Conteúdo de mRNA de Osp, Ptprv e Bglap	51
4.10.2 Sinalização da insulina	53
4.11 Avaliação da expressão de <i>Gprc6a</i>	54
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	62
7 REFERÊNCIAS	63
8 ANEXO 1- CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE ESTEA HEPATOCELULAR UTILIZANDO HEPA1C1C7	
9 ANEXO 2- ARTIGO- OSTEOCALCIN IMPROVES INSULIN RESI AND INFLAMMATION IN OBESE MICE: PARTICIPATION OF WHITI TISSUE AND BONE	ISTANCE E ADIPOSE 73

#### 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 certa de 50% do peso da matriz óssea, sendo cálcio e fosfato os principais íons da parte inorgânica, os quais formam os cristais de hidroxiapatita (Ca10(PO4)6(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 fostato de cálcio essenciais para mineralização da matriz óssea; 2) os osteócitos, originados a partir de osteoblastos quando estes são envoltos 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 gamacarboxiglutâmico (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  $\gamma$ -carboxilação dependente de vitamina K, e realizado pela enzima  $\gamma$ -glutamilcarboxilase, 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 muitos importantes para que os íons de Ca<sup>2+</sup> 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*<sup>-/-</sup>) 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> apresentam características opostas aos camundongos *Esp*<sup>-/-</sup> (LEE et al., 2007).

Estudos sugeriram que a perda de função da OST-PTP em camundongos *Esp<sup>-/-</sup>* aumenta a ativação dos ostoclastos (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 recémdescoberto pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G, GPRC6A (PI et al., 2005). Camundongos *Gprc6<sup>-/-</sup>* 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-a, 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 NFKB (ZHOU et al., 2013). No entanto, em contraposição ao mecanismo proposto de que a ativação de NFKB ocorre durante o estresse de retículo endoplasmático (RE) (TAM et al., 2012), Zhou e colaboradores (2013) observaram que a osteocalcina ativa a via NFKB 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-a, cuja expressão é induzida pela ativação da via do NFKB. 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 NFKB.

#### 2 OBJETIVO

O presente projeto teve como objetivo desvendar alguns mecanismos moleculares da ação de osteocalcina não carboxilada na resistência à insulina e inflamação em músculo esquelético, tecido adiposo, fígado e osso de camundongos obesos, e em adipócitos 3T3-L1.

#### 2.1 Objetivos específicos

Em camundongos controles, obesos (por glutamato monossódico, MSG) tratados ou não com osteocalcina não carboxilada por 28 dias:

1. Avaliar o consumo de água e ração;

2. Mensurar variáveis morfométricas e dosar a concentração plasmática de glicose, frutosamina, insulina e triglicérides;

3. Verificar a resistência à insulina in vivo, por teste de tolerância à insulina;

4. Verificar a gliconeogênese no fígado *in vivo*, por meio do teste de tolerância ao piruvato;

5. Avaliar a resistência à insulina por meio do conteúdo de AKT fosforilada, em fígado, tecido adiposo e fêmur dos animais, e em adipócitos 3T3-L1;

6. Avaliar a resistência à insulina em tecido muscular esquelético gastrocnêmio por meio da análise da expressão de mRNA de *Slc2a4* e conteúdo proteico de GLUT4, por RTqPCR e *Western blotting*, respectivamente;

7. Em fígado, quantificar o conteúdo da proteína GLUT2, por técnica de *Western blotting*; e, avaliar a expressão de mRNA de genes relacionados ao metabolismo de glicose ou à resistência à insulina (*Slc2a2*, que codifica o GLUT2, *Pck1*, que codifica PEPCK-C, e *G6pc*, que codifica a Glicose-6-fosfatase), às vias lipogênica e lipolítica (*Dgat1*, *Cpt1a*, *Srebf isoforma c*) e à inflamação (*Tnfa*);

8. Em tecido adiposo branco periepididimal, avaliar o processo inflamatório por análise histológica e expressão de mRNA de *Tnfa, Il1b, Il6, Ccl2* (codifica proteína quimiotática de monócitos 1), *Nlpr3* (codifica a NACHT) e *Casp1* (codifica Caspase-1), bem como investigar a resistência à insulina por meio da avaliação do conteúdo da proteína GLUT4 (*Western blotting*) e da expressão de mRNA (PCR em tempo real) de *Slc2a4* e *Adipoq* (codifica a adiponectina).

9. Em fêmur, avaliar a resistência à insulina, analisando o conteúdo de AKT fosforilada (*Western blotting*) e a expressão gênica(RT-qPCR) de *Ptprv* e *Osp* (codifica osteoprotegerina).

Em adipócitos 3T3-L1, sob diferentes condições experimentais:

10. Avaliar o conteúdo de mRNA de *Slc2a4, Tnfa, Il1b, Il6, Ccl2, Adipoq*, por PCR em tempo real, e o conteúdo de GLUT4 por técnica de *Western blotting*;

#### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### 3.1 Células

#### 3.1.1 Cultivo e Tratamento

Fibroblastos de camundongo da linhagem 3T3-L1 (banco de cultura de células do Rio de Janeiro, BCRJ) foram propagados e diferenciados de acordo com o protocolo padrão (Furuya et al., 2012) em ambiente umidificado composto por 95% de  $O_2$  e 5% de  $CO_2$ . Os fibroblastos foram propagados em meio DMEM (Vitrocell, Campinas, SP, 25 mM de glicose) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell), penicilina/estreptomicina (100U/ml) até atingirem confluência. Após 2 dias, foi adicionado meio de diferenciação (DMEM, 10% de soro fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina (100 U/mL), 10 µg/ml de insulina, 1 µmol/l de dexametasona, 0,5 mmol/l de 3-isobutil-1-metilxantina) por 6 dias. O meio foi trocado a cada 2 dias. Após esse período, as células diferenciadas foram colocadas em meio de propagação e posteriormente incubadas com osteocalcina não carboxilada recombinante (Cusabio, Hubei, China; 10 ng/mL) e/ou TNF-α (Sigma; 10 ng/mL).

Após a diferenciação e sob restrição de 18 a 20 horas com meio de tratamento (DMEM, 0,02% de Albumina sérica bovina (BSA) e 1% penicilina/estreptomicina (100 U/mL), os adipócitos *in vitro* foram submetidos a 3 tipos de tratamentos: 1) Tratamento com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml), por 24 horas; 2) Desafio com TNF-a (20 ng/ml), por 24 horas; 3) Pré-tratamento com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml), por 6 horas, seguido de desafio com TNF-a (20 ng/ml), por 18 horas. Para o teste de sinalização da insulina dois grupos diferenciados, um sem nenhum tratamento e um tratado com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml) por 24 horas; 6 mante e um tratado com 100 mM de insulina por 5 minutos.

Células MC3T3-E1(BCRJ) foram propagadas em meio de crescimento (alfa MEM, 1 mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina). Ao atingirem confluência estas células foram tratadas com meio osteogênico (meio de crescimento suplementado com 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico e 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato) por 14 ou 21 dias. Para a visualização de nódulos mineralizados, as células foram fixadas com formalina e coradas com solução de Alizarina (2%, pH 4,1- 4,3).

#### 3.2 Animais

Camundongos fêmeas prenhas foram acondicionados em biotério com condições controladas de luz (ciclo de 12/12 horas de claro/escuro) e temperatura  $(23 \pm 2^{\circ}C)$ , e receberam ração (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) *ad libitum*. Logo após o nascimento dos filhotes, os animais machos receberam uma injeção de 2 mg/g peso corpóreo subcutânea de glutamato monossódico (MSG) ou solução salina durante 5 dias consecutivos; e, no sétimo dia, uma injeção de 4 mg/g peso corpóreo (Furuya et al., 2010). Após 21 dias, os animais foram desmamados. Na décima nona semana, foram implantadas s.c. mini-bombas osmóticas (Alzet, Cupertino, CA, USA) para administração contínua de osteocalcina não carboxilada (~ 3ng/h) ou solução salina (veículo) (FERRON et al., 2008; ZHOU et al., 2013). No final da vigésima terceira semana, os animais foram anestesiados *i.p.* (tiopental sódico 50 mg/kg peso corpóreo) e utilizados após a abolição dos reflexos corneanos e retirada da pata ao estímulo da dor. O sangue foi obtido diretamente do ventrículo, coletado em tubos heparinizados e mantido a 4°C até centrifugação (1000 g, 4°C, 10 min). O plasma foi separado e armazenado a -20°C. Imediatamente após a coleta do sangue, amostras do fígado foram coletadas sempre da mesma região.

Para o ensaio de sinalização da insulina, os animais, com 23 semanas de idade e sob restrição alimentar de a 4 a 5 horas foram anestesiados *i.p.* (tiopental sódico 50 mg/kg peso corpóreo). O tecido adiposo branco periepididimal foi coletado antes e 90 segundos após a injeção de insulina (25mU/g de peso corpóreo) na veia porta. A fim de evitar morte por excesso de sangramento, o fígado e o fêmur foram coletados, somente após a administração de insulina (30 s e 120 s, respectivamente).

Para o teste de tolerância à insulina (ITT) os animais foram submetidos a uma restrição alimentar de 4 horas. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos a partir de secção caudal após a sobrecarga intraperitonial (i.p.) de insulina humana regular (Novo Nordisk, Montes Claros, MG), 0,75 U/Kg de peso corpóreo. A glicemia foi determinada com o auxílio de um glicosímetro. A constante de decaimento de glicose (kITT) foi calculada a partir da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores glicêmicos obtidos de 5 a 30 minutos no teste.

Para o teste de tolerância ao piruvato de sódio, os animais foram submetidos a um jejum de 16 horas. O sangue foi coletado pela cauda, após 0, 20, 40 e 60 minutos após a administração de piruvato sódico (2 g/kg peso corpóreo i.p.)

Para estimar o grau de obesidade em camundongos foi utilizado o índice de Lee, definido pela equação: [peso corpóreo (g)]^(1/3)/ comprimento nasoanal (cm); bem como o peso relativo do tecido adiposo branco, TAB (ROGERS; WEBB, 1980; PAPA; SERAPHIM; MACHADO, 1997; FURUYA et al., 2010).

#### 3.2.1 Níveis plasmáticos de glicose, frutosamina, insulina e triglicérides

A concentração de glicose, frutosamina e triglicérides foi avaliada por método enzimático- colorimétrico (Glicose Liquiform, Frutosamina e triglicérides respectivamente; Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Ainda, as concentrações de insulina plasmática e osteocalcina não carboxilada foram avaliadas por meio do método colorimétrico ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

#### 3.3 Extração de RNA

Fragmentos dos tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e o RNA total das amostras, tanto de tecido quanto de amostras celulares, foi extraído pela técnica do Trizol segundo as recomendações estabelecidas (GIBCO, Gaithersburg, USA). A extração dos tecidos foi realizada com 1 mL de solução de Trizol, por 0,1 g de tecido, que foram homogeneizados em Polytron. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio ao homogeneizado de um 1 mL tanto de tecidos quanto das linhagens celulares, que foi centrifugado a 12.000 rpm. Recuperada a fase aquosa superior, adicionou-se 0,5 mL de isopropanol e novamente, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm para obtenção de precipitado. A este, adicionou-se etanol a 70% para ressuspender o pellet e uma nova centrifugação a 12.000 rpm foi feita. O precipitado final, seco o suficiente para eliminar o resíduo de etanol, foi ressuspendido em diferentes volumes de água DEPC (água tratada previamente com Dietil pirocarbonato – Sigma, S. Louis, USA). Após foi realizada a leitura por absorbância e foi feito o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a aproximadamente 40 μg/mL de fita simples e a relação DO260/DO280, entre 1,8 e 2,0 permitiu estimar a pureza do ácido nucléico da amostra.

#### **3.4 RT-qPCR – PCR em tempo real**

A reação de transcrição reversa para a síntese de cDNA, foi feita a partir da adição, a 1  $\mu$ g de RNA total da amostra, de 1  $\mu$ L de ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, USA), 1  $\mu$ L de *primers* Oligo dT (0,5  $\mu$ g) (Life Technologies, USA), 1  $\mu$ L de nucleotídeos dNTP mix (0,5 mM) (Invitrogen Life Technologies, USA), 2,4  $\mu$ L de MgCl2 (3 mM) (Promega, USA), 4  $\mu$ L de Improm-II 5XTM reaction buffer (1X) (Promega, USA) e água livre de nucleasse para volume final de 20  $\mu$ L. Após transcrição reversa, os cDNAs sintetizados foram utilizados para realização da PCR em tempo real, no aparelho Step One Plus Instrument (Applied Biosystems, Forest City, CA, EUA). A amplificação do cDNA foi realizada com Platinum ® SYBR ® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) utilizando o aparelho *StepOne*<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A medida da expressão do mRNA dos genes foi obtida em relação ao gene de referência pelo  $\Delta$ Ct gene alvo e gene de referência. A quantificação do mRNA alvo foi analisada em relação ao seu controle pela diferença dos  $\Delta$ Ct e a expressão em vezes de mudança pela fórmula  $\Delta\Delta$ Ct.

Gene	GenBank	Sense	Antisense
Actb	NM_007393.5	ACTGGGACGACATGGAGAAG	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
Adipoq	NM_009605	TGGATCTGACGACACCAAAA	CGAATGGGTACATTGGGAAC
Bglap	NM_007541	GAGGACCATCTTTCTGCTCACT	TCACTACCTTATTGCCCTCCTG
Casp1	NM_009807.2	GGACCCTCAAGTTTTGCCCT	CAGATCCTCCAGCAGCAACT
Ccl2	NM_011333.3	AGGCTGGAGAGCTACAAGAGG	GCTGAAGACCTTAGGGCAGAT
Cptla	NM_013495.2	GCTGGGCTACTCAGAGGATG	GAAGGAATGCAGGTCCACAT
Dgat1	NM_010046.2	GCTTCTGCAGTTTGGAGACC	CTCATGGAAGAAGGCTGAGG
G6pc	NM_008061.3	TCTGTCCCGGATCATCCTTG	GTAGAATCCAGGCGCGAAAC
Gapdh	NM_008084	GAAGGTCGGTGTGAACGGATT	AAGACACCAGTAGACTCCACGA
Gprc6a	NM_153071.1	ACGTCTTCATCACCACAAACC	TTGCATAAAAGGCAGTGATCC
Il1b	NM_008361	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	CTCTGCTTGTGAGGTGCTGA
Il6	NM_031168	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	TCCAGTTTGGTAGCATCCATC
Nfkb1	AY521463.1	CTGACCTGAGCCTTCTGGAC	GCAGGCTATTGCTCATCACA
Nlrp3	NM_145827.3	CTGCACCCGGACTGTAAACT	ACCTCACAGAGGGTCACCAC
Pck1	NM_011044.2	ATGCTGATCCTGGGCATAAC	CCGTTTTCTGGGTTGATAGC
Ptprv	NM_007955.3	CAGCTCTCCAGAGACCATCC	AACTCCTGGGAAAAGCCATT
Rela	AF199371.1	GCAAGGGCATTATCGACTCT	CATAACGTTGCAGGAAGCTG
Rplp0	NM_007475	CTGAACATCTCCCCCTTCTCC	ATCCCATATCCTCATCTGATTCC
Slc2a2	NM_031197.2	GCCTGTGTATGCAACCATTG	CGTAACTCATCCAGGCGAAT
Slc2a4	NM_009204.2	CTGTGCCATCTTGATGACCGTG	GTTGGAGAAACCAGCGACAGC
Srebf isoforma c	NM_001001144.3	ATCGGCGCGGAAGCTGTCGGGGT AGCGTC	ACTGTCTTGGTTGTTGATGAGCT GGAGCAT
Tnfa	NM 013693	GAACTGGCAGAAGAGGCACT	GGTCTGGGCCATAGAACTGA

Tabela 1- Detalhamentos dos primers utilizados para o RT-qPCR.

#### 3.5 Extração proteica e Western blotting

Amostras de fígado foram homogeneizadas em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) a 20.000 rpm, em tampão de homogeneização (Tris 10 mM; EDTA 1,0 mM; sacarose 250 mM), na proporção de 1:6 (peso: volume), e centrifugadas a 2000 rpm, 4°C, 15 minutos. O sobrenadante recuperado foi centrifugado (12000 rpm, 4°C, 20 minutos). O precipitado resultante, constituído de uma fração enriquecida em proteínas de membrana plasmática e de organelas foi somado a 1 mL de tampão para homogeneização.

Os músculos gastrocnênios foram pulverizados utilizando nitrogênio líquido e transferidos para tubos de 1,5 mL, posteriormente se procedeu de igual forma para a extração da fração de proteínas enriquecida com membranas de células 3T3-l1 e MC3T3-E1 e tecidos adiposos, em que houve a homogeneização em tampão de homogeneização (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; sacarose 250 mM), sendo que para a homogeneização do tecido adiposo e do músculo se usou a Polytron PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) a 20.000 rpm. Posteriormente, os homogenatos foram centrifugados a 1000 g por 10 min a 4°C; o sobrenadante foi recuperado e centrifugado novamente a 100.000 g por 75 min a 4°C. O pellet resultante foi ressuspendido no tampão, e constituiu uma fração enriquecida em proteínas de membranas plasmática.

Para a extração de proteínas fosforiladas (pAKT) os tecidos foram pulverizados utilizando nitrogênio líquido, sendo que para homogeneização dos tecidos e das células 3T3-L1 utilizou-se em tampão de extração (TRIS 100 mM pH7,5; EDTA 10 mM; pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 10 mM; PMSF 2 mM diluído em etanol, Triton X-100 1%; 0,01 mg/ml de aprotinina). O homogeneizado foi centrifugado (12000 rpm, 4°C, 20 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para avaliação do grau de fosforilação de pAKT, bem como avaliar o conteúdo de AKT total.

Para extração de proteína nuclear houve a raspagem das placas contendo as células 3T3-L1 com tampão fosfato-salina (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; KH2PO4 1,27 mM; Na2HPO4 8,06 mM, pH 7,2, acrescido de DTT 0,2 mM e PMSF 0,2 mM), após as amostras foram submetidas à centrifugação a 2000g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi dispensado e o pellet foi ressuspendido em tampão de lise (HEPES-KOH 10 mM, pH 7,9; EDTA 0,1 mM; MgCl2 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,2 mM; PMSF 0,2 mM; leupeptina 5 µg/mL; aprotinina 15 µg/mL). As amostras foram incubadas durante 15 minutos sobre o gelo, após adicionou-se Nonidet P-40 10%, realizou-se agitação vigorosa e centrifugação a 11.000g, por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante, correspondente à fração de proteínas citoplasmáticas, foi estocado e o pellet foi ressuspendido em tampão de extração (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9; MgCl2 1,5 mM; EDTA 0,25 mM; DTT 0,2 mM; NaCl 300 mM; Glicerol 25%; PMSF 0,2 mM; leupeptina 5  $\mu$ g/ml; aprotinina 15  $\mu$ g/ml) e incubado por 20 minutos sobre gelo. O extrato nuclear foi centrifugado a 11.000 g, por 20 minutos a 4 °C. E o sobrenadante correspondente à fração com proteínas nucleares foi coletado e armazenado a -80 °C.

Os homogeneizados foram armazenados a -20°C. A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (Sodium Duodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990) que envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos para o empacotamento (stacking gel) e separação (resolving gel) das amostras, que foram acrescidas de glicerol 15%, Tris 0,05M, bromofenol blue 0,05%, SDS 9%, com 6% de 2-mercaptoetanol, 1:1, fervidas por 5 minutos e colocadas em gelo. A eletroforese foi realizada em tampão Tris HCL 25mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, EDTA 2mM, pH8,3, com amperagem constante e corrente fixa a 75V para o gel de empacotamento e corrente constante e amperagem fixa a 90 mA para o gel de separação. A transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose HybondECL (Amersham, Buckinghahmshire, UK), foi realizada sob corrente constante de 35mA, durante 18 horas, a 4°C, em tampão Tris HCL 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas e incubadas com anticorpos primários específicos por até 24h: anti-GLUT2 (Millipore), anti-GLUT4 (07-1404 Millipore), anti-RELA (Ab7970-Abcam), anti-fosfo-AKT1/2/3 (Ser 473, sc-7985-R), e anti-AKT (H-136, sc8312), estes dois últimos da Santa Cruz Biotecnologia. Após lavagens, as membranas foram incubadas em solução de leite 1% e anticorpo secundário (HRP) por 1 hora e as bandas reveladas por quimioluminescência. A membrana foi imediatamente exposta a filme de RX (Hyperfilm – Amersham, Buckinghamshire, UK). Para normalização dos resultados, antes de incubadas, as membranas foram coradas em ponceau e digitalizadas A intensidade dos blots foi avaliada por densitometria óptica (software Image Quant TL, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SW) e o resultado numérico expresso em unidades arbitrárias (UA). A média do grupo controle em cada membrana foi considerada como 100 e cada valor individual foi normalizado em relação ao ponceau. O conteúdo das proteínas alvo foi calculado com base nestes valores e expressos em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g).

#### 4 RESULTADOS

#### 4.1 Variáveis Morfométricas

A partir das variáveis morfométricas (Tabela 2) é possível perceber que o grupo controle (C) difere significativamente em todas as variáveis analisadas em relação aos grupos obeso não tratado (OB) e obeso tratado com osteocalcina não carboxilada (OB-OC). Em relação aos animais controles, os animais obesos tratados ou não com osteocalcina apresentaram aumento de peso corpóreo (26%, OB vs C; 25%, OB-OC vs C; P<0,001), e redução de comprimento nasoanal (5%, OB vs C, P<0,001; 4%, OB-OC vs C, P<0,01), o que resultou no aumento do índice de Lee (11%, OB vs C; 10% OB-OC vs C; P<0,001). Outro aspecto importante foi a diferença encontrada em relação ao peso do TAB. Os grupos obeso e obeso tratado com osteocalcina apresentaram aumento do peso deste tecido em relação ao grupo controle (65%, OB vs C; 36%, OB-OC vs C; P<0,001). Vale ressaltar que ocorreu uma diminuição no peso do TAB periepididimal dos camundongos obesos tratados com osteocalcina em relação aos dosteos não tratados (17%, OB-OC vs OB, P<0,05).

**C** (**n**) OB (n) **OB-OC** (n)  $43.15 \pm 0.61$  (13) 54,56 ± 0,88 (9) \*\*\* 53,8 ± 0,86 (5) \*\*\* Peso corporal (g) Comprimento 10,14 ± 0,08 (11) \*\*\* 10,20 ± 0,10 (6) \*\* nasoanal (cm)  $10,63 \pm 0,05$  (9) Índice de Lee  $33,68 \pm 0,32$  (13) 37,49 ± 0,27 (11) \*\*\* 36,90 ± 0,36 (6) \*\*\* Peso TAB  $1,22 \pm 0,05$  (7) \*\*\* 1,01 ± 0,05 (6) \*\*\* # do periepididimal (g)  $0,74 \pm 0,04$  (13) 2,16 ± 0,13 (8) \*\*\* 1,90 ± 0,11 (6) \* Peso Relativo do TAB periepididimal\*100  $1,53 \pm 0,05$  (9)

**Tabela 2-** Variáveis morfométricas de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC)

TAB, tecido adiposo branco periepididimal. O peso do TAB apresentado corresponde somente ao tecido do lado esquerdo do animal. (n) corresponde ao número de animais. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 a 13 animais. \*P<0,05 vs C, \*\*P<0,01 vs C, \*\*\*P<0,001 vs C, # P<0,05 vs OB, ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

#### 4.2 Consumo de ração e água

Não foi observada diferença significativa entre os grupos no que se refere a ingestão de ração ou de água antes ou durante o período de tratamento (Tabela 3).

 Tabela 3- Consumo de ração e água de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC).

 OB
 OB

	C	OB	OB-OC
Consumo de ração antes do tratamento (g/dia/animal)	4,24 ± 0,09	4,37 ± 0,22	$4,62 \pm 0,10$
Consumo de água			
(mL/dia/animal)	5,15 ± 0,23	4,93 ± 0,13	5,73 ± 0,64
Consumo de ração durante o tratamento			
(g/dia/animal)	4,33 ± 0,09	4,51 ± 0,38	$4,\!86\pm0,\!09$
Consumo de água durante o tratamento			
(mL/dia/animal)	$5,22\pm0,17$	$5,\!29\pm0,\!39$	$6{,}28\pm0{,}6$

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 7 a 13 animais. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls

# 4.3 Concentrações plasmáticas de glicose, frutosamina, insulina, osteocalcina não carboxilada e triglicérides.

Não houve diferença na concentração plasmática de glicose entre os grupos (Tabela 4).

A frutosamina plasmática, capaz de refletir as variações glicêmicas de duas ou três semanas anteriores ao teste, apresentou níveis acentuados nos camundongos obesos em relação aos controles (35%, OB *vs* C P<0,05) (Tabela 4).

Adicionalmente, a concentração da insulina detectada no grupo obeso foi muito maior do que a apresentada pelos controles (5,7 vezes, OB *vs* C, P<0,05) (Tabela 4).

Por fim, os níveis de triglicérides dosados não tiveram diferença entre os grupos (Tabela 4).

	<b>C</b> ( <b>n</b> )	<b>OB</b> ( <b>n</b> )	<b>OB-OC</b> (n)
Glicose (mg/dL)	161,0 ± 19,34 (8)	187,0 ± 19,29 (8)	173,6 ± 14,24 (7)
Frutosamina (µMol/L)	189,60 ± 21,10 (8)	256,10 ± 11,16 (9) *	228,70 ± 9,89 (4)
Insulinemia (ng/ml)	0,81 ± 0,24 (4)	4,65 ± 1,12 (5)*	3,68 ± 0,90 (4)
Osteocalcina não carboxilada (ng/mL)	1,8±0,1(7)	0,7±0,1 (9)***	2,0±0,1 (7)###
Triglicérides (mg/dL)	92.04± 3.76 (6)	97,83 ± 6,82 (5)	88,55 ± 19,69(5)

**Tabela 4-** Concentrações plasmáticas de glicose, frutosamina, insulina, osteocalcina não carboxilada, e triglicérides de animais de animais controle (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC).

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 a 9 animais.. \*P<0,05 vs C, \*\*\*P<0,001 vs C, ## P<0,01, ### P<0,001 vs OB. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls

#### 4.4 Teste de tolerância à insulina *in vivo*

No teste de tolerância à insulina (Figura 2), menores valores da constante de desaparecimento (kITT) estão relacionados a um estado de menor sensibilidade à insulina. Os animais obesos apresentaram menor valor de kITT em relação ao controle (65%, OB *vs* C, P<0,001). Por outro lado, os animais obesos tratados com osteocalcina apresentaram maior kITT em relação aos animais obesos (2,2 vezes, OB-OC *vs* OB, P<0,05).



**Figura 2- Teste da resistência à insulina** *in vivo*. No teste de tolerância à insulina, insulina regular (0,75 U/kg peso corpóreo) foi administrada (*i.p.*), após 4 horas de restrição alimentar, a animais de 23 semanas de idade subdivididos em animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OCN). O sangue foi coletado pela cauda e a glicemia foi dosada nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após a injeção de insulina. Os valores de 5 a 30 minutos foram utilizados para calcular a constante de desaparecimento da glicose (kITT). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 a 8 animais; \*\*\*P<0,001 *vs* C, #P<0,05 *vs* OB; ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

#### 4.5 Teste de tolerância ao piruvato *in vivo*

O teste de tolerância ao piruvato (Figura 3) está relacionado ao estudo da ativação da via da gliconeogênese, e o fígado é o principal órgão para este processo. A análise da área sob a curva indica a intensidade de ativação da gliconeogênese, que é um processo em que moléculas de glicose são sintetizadas por precursores como lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos, sendo que produtos não glicídicos, como o lactato e alguns aminoácidos, são convertidos no a-cetoácido piruvato, que posteriormente por uma série de reações enzimáticas será convertido em glicose (MARZZOCO e TORRES, 2007). O piruvato é um importante regulador da gliconeogênese para a manutenção da taxa glicêmica, principalmente no período de restrição alimentar. Os resultados mostram que o processo da gliconeogênese está aumentado nos camundongos obesos em relação aos controles (90%, OB *vs* C, P<0,05), e que o tratamento com osteocalcina previne o aumento da atividade desta via nos camundongos obesos (redução de 36%, OB-OC *vs* OB, P<0,05).



**Figura 3-Teste de tolerância ao piruvato** *in vivo*. Piruvato sódico (2 g/kg peso corpóreo) foi administrado (*i.p.*), após jejum de 16 horas, a animais de 22 semanas de idade subdivididos em animais controles (C), obesos (OB) e obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 21 dias (OB-OC). O sangue foi coletado pela cauda, e (A) a glicemia foi dosada ao longo de 60 minutos. (B) A partir do gráfico obtido, a área sob a curva foi calculada. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*P<0,05 *vs* C, # P<0,05 *vs* OB. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

#### 4.6 Músculo Esquelético Gastrocnêmio

#### 4.6.1 Conteúdo de mRNA de Slc2a4 e de proteína GLUT4

A análise do conteúdo proteico de GLUT4 (Figura 4-B) e de seu respectivo mRNA, *Slc2a4* (Figura 4-A), no músculo gastrocnêmio não indicou diferença significativa entre os grupos controle, obeso e obeso tratado com osteocalcina não carboxilada.



Figura 4- Conteúdo de mRNA de *Slc2a4*(A) e de proteína GLUT4(B) em músculo gastrocnêmio de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). O músculo gastrocnêmio foi coletado de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. (A) Análise de mRNA feita por RT-qPCR (B) Análise proteica GLUT4 em unidades arbitrárias (UA) por  $\mu$ g de proteína aplicada no gel; os resultados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas do tecido. (C) Blots representativos. Os resultados são apresentados como média ± EPM de 5 a 7 animais por grupo. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

#### 4.7 Fígado

#### 4.7.1 Conteúdo de mRNA de Slc2a2, e de proteína GLUT2

Verificamos que o conteúdo de mRNA de *Slc2a2* (Figura 5-A) está aumentado no fígado dos camundongos do grupo obeso e obeso tratado com osteocalcina em relação ao grupo controle (1,53 vezes, OB vs C; 1,66 vezes, OB-OC vs C; P<0,01). Esse mesmo perfil de aumento em relação aos animais controles foi encontrado no conteúdo proteico de GLUT2 (1,80 vezes, OB vs C; 1,70 vezes, OB-OC vs C; P<0,01) (Figura 5-C).



Figura 5- Conteúdo de mRNA de *Slc2a2* (A) e de proteína GLUT 2 (B) em fígado de animais controles (C), obesos (OB) e obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). O fígado foi coletado de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. (A) Análise de mRNA feita por RT-qPCR. (B) Blots representativos (C) Análise proteica de GLUT2 em unidades arbitrárias (UA) por  $\mu$ g de proteína aplicada no gel. Os resultados da proteína GLUT2 foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas do tecido (coloração por Ponceau). Os resultados são apresentados como média ± EPM de 5 a 7 animais por grupo. \*P<0,05 vs C \*\*P< 0,01 vs C. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.
#### 4.7.2 Conteúdo de mRNA de genes relacionados com lipogênese e lipólise

Genes de enzimas importantes da via de lipogênese (*Dgat1*) e da via de lipólise (*Cpt1*) foram analisados.

A expressão do gene *Dgat1* (Figura 6-A), que codifica para diacilglicerol Oaciltransferase 1, enzima envolvida na lipogênese, se mostrou aumentada significativamente nos grupos obeso e obeso tratado com osteocalcina em relação ao controle (1,24 vez, OB vs C; 1,25 vez, OB-OC vs C; P<0,05). Em adição, o tratamento com osteocalcina não foi capar de reduzir a expressão *Dgat1* no fígado dos camundongos obesos.

A expressão do gene *Cpt1* (Figura 6-B), codifica a carnitina palmitoil transferase, que é uma enzima está envolvida na lipólise, se manteve inalterada entre os grupos.

A expressão do gene *Srebf1 isoforma c* (Figura 6-F), que codifica para o fator de transcrição SREBP-1C, no grupo obeso e no grupo obeso tratado se mostrou aumentada em relação ao controle (2,88 vezes, OB *vs* C, P<0,001; 1,93 vez, OB-OC *vs* C, P<0,01), e o tratamento com osteocalcina reduziu a expressão deste fator transcricional em relação ao grupo obeso (33%, OB-OC *vs* OB, P<0,05).

#### 4.7.3 Conteúdo de mRNA de genes relacionados com gliconeogênese

Em adição genes de proteínas que possuem função chave no controle da velocidade da via gliconeogênica (*Gp6c* e *Pck1*) foram analisados também. Os resultados também mostram que a expressão de *Pck1* (Figura 6-C), que codifica a proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinase, se manteve inalterada entre os grupos, e que a expressão de *G6pc* (Figura 6-E), que codifica a enzima glicose-6-fostatase (G6Pase) foi reduzida nos grupos obesos e obesos tratados com osteocalcina em relação ao grupo controle (55%, OB *vs* C; 52%, OB-OC *vs* C; P<0,05).

## 4.7.4 Conteúdo de mRNA de gene relacionado com inflamação

•

A expressão de *Tnfa* (Figura 6-D), que codifica para a proteína TNF-a, aumentou nos grupos obesos em relação ao controle (2,61 vezes, OB *vs* C, P<0,05). Já o tratamento dos obesos com osteocalcina foi capaz de reverter esse aumento, reduzindo a expressão dessa citocina (39%, OB-OC *vs* OB, P<0,05).



Figura 6- Conteúdo de mRNA de *Dgat1* (A), *Cpt1a* (B), *Pck1* (C), *Tnfa* (D), *G6pc* (E) e *Srebf isoforma c* (F) em fígado de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). O fígado foi coletado de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. Análise de mRNA feita por RT-qPCR. Os resultados foram normalizados de forma ao grupo controle corresponder o valor 1. Os resultados são apresentados como média ± EPM de 5 a 7 animais por grupo. \*P<0,05 vs C \*\*P<0,01 vs C \*\*\*P<0,001 vs C #P<0,05 vs OB. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

#### 4.7.5 Sinalização Insulínica

No fígado do grupo obeso, a fosforilação da AKT (Figura 7-B) em resposta ao estimulo com insulina reduziu em relação ao grupo controle (66% *vs* C, P<0,05); por outro lado, o tratamento com osteocalcina recuperou a sinalização da insulina em animais obesos.



Figura 7- Sinalização da insulina em fígado de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). O fígado foi coletado 30 segundos após a injeção de insulina (25 mU/g de peso corpóreo) na veia porta de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. (A) Blots representativos. (B)Conteúdo da proteína pAKT/AKT total em unidades arbitrárias (UA) por  $\mu$ g de proteína aplicada no gel, os resultados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas do tecido. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 3 a 4 animais por grupo, \*\*\**P*<0,001 *vs* C, ##*P*<0,05 *vs* OB ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

## 4.7.6 Densidade volumétrica de gordura no fígado

Através da análise histológica foi possível perceber que a densidade volumétrica de gordura no fígado esteve aumentada nos grupos obesos (37%, OB *vs* C; 43%, OB-OC *vs* C; P<0,05).



**Figura 8- Densidade volumétrica de gordura em fígado de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC).** O fígado foi coletado de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. Análise microscópica de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. Os resultados são apresentados como média ± EPM de 5 a 7 animais por grupo. \*P<0,05 *vs* C. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

## 4.8 Tecido Adiposo Periepididimal

#### 4.8.1 Conteúdo de mRNA de Adipoq, Slc2a4 e de proteína GLUT4

O TAB dos animais obesos, em relação aos controles, apresentou redução dos níveis de mRNA de *Slc2a4* (Figura 9-B) (87%, OB *vs* C, P<0.001) e *Adipoq* (Figura 9-A) (85%, OB *vs* C, P<0.001), bem como redução da proteína GLUT4 (Figura 9-C) (60%, OB *vs* C, P<0.001).

Interessantemente, o tratamento com osteocalcina não carboxilada mostrou ser capaz de aumentar o conteúdo de *Slc2a4* (Figura 9-B) (3,5 vezes, OB-OC *vs* OB, P<0,05) e da proteína GLUT4(Figura 9-C) (3,5 vezes, OB-OC *vs* OB, P<0,05) no TAB de camundongos obesos. Por outro lado, a osteocalcina não foi capaz de alterar a expressão de adiponectina nesse tecido (Figura 9-A).



Figura 9- Conteúdo de mRNA de *Adipoq* (A), *Slc2a4* (B) e de proteína GLUT4 (D) no tecido adiposo branco periepididimal de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). O tecido adiposo branco periepididimal foi obtido de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. (A) e (B) Análise de mRNA feita por RT-qPCR. (C) Análise da proteína GLUT4 em unidades arbitrárias (UA) por  $\mu$ g de proteína aplicada no gel; os resultados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas do tecido. (D) Blots representativos. Os resultados são apresentados como média ± EPM de 5-7 animais por grupo, \*P<0,05 vs C, \*\*P< 0.01 vs C, #P<0,05 vs OB. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

#### 4.8.2 Sinalização insulínica

No tecido adiposo periepididimal do grupo obeso, foi observada uma redução de fosforilação da AKT (Figura 10-B), em resposta ao estímulo com insulina (48% vs C, P<0,05); no entanto, o tratamento com osteocalcina recuperou parcialmente esse quadro em animais obesos.



Figura 10- Sinalização da insulina em tecido adiposo branco de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). O tecido adiposo branco periepididimal foi coletado antes (-) e 90 segundos após (+) a injeção de insulina (25mU/g de peso corpóreo) na veia porta de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. (A) Blots representativos. (B) Conteúdo da proteína pAKT/AKT total em unidades arbitrárias (UA) por  $\mu$ g de proteína aplicada no gel, os resultados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas do tecido. Os resultados são apresentados como média ± EPM de 3 a 4 animais por grupo. † P<0,05 vs basal (-) do mesmo grupo, *f* P< 0.05 vs C(+), & P< 0.05 vs OB(+). ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls

#### 4.8.3 Conteúdo de mRNA de Tnfa, Ccl2, Il1, Il6, Nlrp3 e Casp1

O conteúdo de mRNA de genes pró-inflamatórios como: *Tnfa* (Figura11-A), *Il1b* (Figura11-B), *Il6* (Figura11-C) *e Ccl2* (Figura11-D), que codifica a proteína CCL2, também conhecida por proteína quimiotática de monócitos 1, foi analisado em TAB periepididimal. No grupo obeso, todos os genes supracitados apresentaram aumento expressivo em relação ao controle (6,15 vezes, para *Tnfa*, OB *vs* C; 4,89 vezes, para *Ccl2*, OB *vs* C; 81,59 vezes, para *Il1*, OB *vs* C; 15,5 vezes, para *Il6*, OB *vs* C; P<0,001).

Adicionalmente, os genes relacionados com a maquinaria do inflamassomo foram analisados. No TAB dos animais obesos em relação ao grupo controle foi observado um aumento expressivo do conteúdo de mRNA de *Casp1* (Figura11-E) e *Nlrp3* (Figura11-F) e, que codificam respectivamente as proteínas CASP1 (Caspase1) e NLRP3 (3,35 vezes, para *Casp1*, OB *vs* C, P<0,001; 7,39 vezes, para *Nlrp3*, OB *vs* C, P<0,01).

Interessantemente, o tratamento dos animais obesos com osteocalcina reduziu a expressão de todos estes genes analisados no TAB (60%, para *Tnfa*, OB-OC *vs* OB, P<0,001; 54%, para *Ccl2*, OB-OC *vs* OB, P<0,001; 95%, para *Il1*, OB-OC *vs* OB, P<0,001; 68%, para *Il6*, OB-OC *vs* OB, P<0,001; 43%, para *Nlrp3*, OB-OC *vs* OB, P<0,05; 29%, para *Casp1*, OB-OC *vs* OB, P<0,05).



Figura 10- Conteúdo de mRNA de *Tnfa* (A), *Il1b* (B), *Ccl2* (C), *Il6* (D), *Casp1* (E) e *Nlrp3* (F) no tecido adiposo branco periepididimal de animais controles (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). O tecido adiposo branco periepididimal foi coletado de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 a 7 animais por grupo. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 *vs* C #P<0.05, ###P<0,001 *vs* OB. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

### 4.8.4 Análise histológica

A análise histológica do TAB periepididimal (Figura 12-A) dos camundongos obesos indicou a presença difusa de infiltrados linfocitários, fibrose e presença de coroa de macrófagos. Interessantemente, o tratamento com osteocalcina não carboxilada preveniu a fibrose e a infiltração linfocitária, além de reduzir os focos representado pela redução de coroas de macrófagos

Os animais obesos, tratados ou não, apresentam adipócitos com maior área (Figura 12-B).



**Figura 12-** Análise histomorfométrica do tecido adiposo branco periepididimal de animais controles (C), obesos (OB) e obesos tratados com osteocalcina por 28 dias (OB-OC). (A) Coloração por hematoxilina e eosina. As setas indicam focos inflamatórios, constituídos de adipócitos hipertróficos cercados por coroa de macrófagos. O asterisco indica área de fibrose e infiltrado difuso de linfócitos. (B) Mensuração da área do adipócito. \*\*\*P< 0.001 *vs* C

#### 4.9 Adipócitos 3T3-L1

Para a avaliação de ação da osteocalcina sobre adipócitos *in vitro* foram utilizados adipócitos murinos 3T3-L1 sob 3 tipos de tratamentos: 1) Tratamento com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml), por 24 horas; 2) Desafio com TNF-a (20 ng/ml), por 24 horas; 3) Pré-tratamento com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml), por 6 horas, seguido de desafio com TNF-a (20 ng/ml), por 18 horas.

## 4.9.1 Conteúdo de mRNA de Slc2a4 e de Proteína GLUT4

TNF-a nas concentrações de 20 e 40 ng/ml foi capaz de reduzir a expressão da proteína GLUT4 após 24 horas de incubação (Figura 13-A).

A análise da curva dose-resposta de osteocalcina não carboxilada sobre o conteúdo de mRNA de *Slc2a4* por 24 horas (Figura 13-B) apontou que somente a concentração de 20 ng/ml de osteocalcina não carboxilada foi capaz de aumentar o conteúdo de *Slc2a4* de forma significativa em relação ao controle (88%, OC(20) vs C, P<0,05).



**Figura 13- Conteúdo de mRNA de** *Slc2a4* **e de proteína GLUT4 de células 3T3-L1 sob diferentes condições experimentais.** (A) Blots representativos de GLUT4 de células 3T3-L1 em desafio com diferentes concentrações de TNF-a por 24 horas. (B) Conteúdo de mRNA de *Slc2a4* em células 3T3-L1 sob tratamento com diferentes concentrações de osteocalcina não carboxilada (0,2, 2,0, 20 ng/ml) por 24 horas. Análise de mRNA feita por RT-qPCR. Os resultados são apresentados como média ± EPM de 3 experimentos independentes. \* P<0,05 *vs* C. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

O tratamento com 20ng/mL de TNF-a por 24 h reduziu a expressão do gene *Slc2a4* (60%, TNF *vs* C, P<0,001), o conteúdo de GLUT4 (47%, TNF *vs* C, P<0,05) e a expressão do gene de adiponectina (67%, TNF *vs* C, P<0,001) (Figura 14).

O tratamento somente com a osteocalcina não carboxilada foi capaz de aumentar a expressão do gene *Slc2a4* (71%, OC *vs* C, P<0,001), o conteúdo de GLUT4 (75%, OC *vs* C, P<0,05) e a expressão do gene de adiponectina (22%, OC *vs* C, P<0,001). Adicionalmente o pré-tratamento com osteocalcina recuperou parcialmente o efeito negativo do TNF-a na expressão do gene *Slc2a4* e no conteúdo proteico de GLUT4 e não teve nenhuma ação sobre a redução da expressão de *Adipoq* (Figura 14).



Figura 14– Conteúdo de mRNA de *Adipoq*(A), *Slc2a4*(*B*), e proteína GLUT4 (C) em células 3T3-L1 sob diferentes condições experimentais. Células em restrição (18 a 20 hs), foram separadas em diferentes grupos: células não tratadas (C); células tratadas com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml), por 24 horas (OC); células desafiadas com TNF-a (20 ng/ml), por 24 horas (TNF); e, células pré-tratadas com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml), por 6 horas, seguido de desafio com TNF-a (20 ng/ml), por 18 horas (TNF-OC). (A) e (B) Análise de mRNA feita por RT-qPCR. (C) Análise da proteina GLUT4 em unidades arbitrárias (UA) por  $\mu$ g de proteína aplicada no gel, os resultados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas do tecido. (D) Blots representativos. Os resultados são apresentados como média ± EPM de 3 experimentos independentes. \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001 *vs* C †*P*<0,05, ††† *P*<0,001 *vs* OB, *ff* P<0,01, *fff* P<0,001 ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

Interessantemente, o tratamento somente com a osteocalcina não carboxilada por 24 horas foi capaz de aumentar a sensibilidade da insulina, induzindo o aumento da fosforilzação da AKT após o estímulo agudo com insulina (42%, OC+ *vs* C+, P<0,05) (Figura 15)



Figura 15- Relação do conteúdo proteína pAKT pelo conteúdo de AKT no teste de sinalização da insulina em adipócitos 3T3-L1. Teste realizado em dois grupos diferenciados, um só com meio de tratamento (C) e um tratado com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml) por 24 horas (OC), foram estimulados (+) ou não (-) com 100mM de insulina por 5 minutos. (A) Blots obtidos no *Western Blotting* de parte das amostras dos grupos e suas respectivas faixas de proteínas totais destacada pela coloração da membrana por Ponceau. (B) Análise proteica de pAKT e AKT em unidades arbitrárias (UA) por µg de proteína aplicada no gel, os resultados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 5-7 animais por grupo, # P<0,05 ## P<0,01 vs basal (-) do mesmo grupo, & P< 0.05 vs C (+). ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

## 4.9.2 Conteúdo de mRNA de Tnfa, Ccl2, Nfkb1 e Rela.

O pré-tratamento com osteocalcina não carboxilada foi capaz de prevenir a inflamação induzida por TNF-a, resultando em redução da expressão de *Tnfa* (41%, OC-TNF *vs* TNF, P<0,01), *Ccl2* (31%, OC-TNF *vs* TNF, P<0,05) e *Nfkb1*(28%, OC-TNF *vs* TNF, P<0,05), sem alteração na expressão gênica de *Rela* (Figura 16).

Adicionalmente, o pré-tratamento com osteocalcina preveniu parcialmente o aumento do conteúdo nuclear da subunidade p65 do NFKB (30%, OC-TNF *vs* TNF, P<0,05) (Figura 16).



Figura 16– Conteúdo de mRNA de *Tnfa* (A), *Ccl2* (B), *Nfkb1* (C) e *Rela* (D) e de proteína nuclear p65 de células 3T3-L1 sob diferentes condições experimentais. Célula sem restrição (18 a 20 hs), foram separadas em diferentes grupos: células não tratadas (C); células tratadas com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml), por 24 horas (OC); células desafiadas com TNF-a (20 ng/ml), por 24 horas (TNF); e, células pré-tratadas com osteocalcina não carboxilada (20 ng/ml), por 14 horas (TNF-OC). (A), (B), (C) e (D) Análise de mRNA feita por RT-qPCR. (E) Análise do conteúdo de subunidade p65 da proteína NFKB em unidades arbitrárias (UA) por  $\mu$ g de proteína aplicada no gel, os resultados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas do tecido. (F) Blots representativos. Os resultados são apresentados como média ± EPM de 3 experimentos independentes. \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001 *vs* C †*P*<0.05, ††† *P*<0.001 *vs* OC, *f*P<0.05 *vs* TNF. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

#### 4.10 Fêmur

#### 4.10.1 Conteúdo de mRNA de Osp, Ptprv e Bglap

O aumento da expressão em osteoblastos de Osteoprogesterina (*Osp*) (Figura 17-A) e da proteína tirosino fosfatase (*Ptprv*) (Figura 17-B) indicam um quadro de resistência à insulina no osso. No fêmur a expressão de *Osp* e *Ptprv* aumentou (53% e 49% respectivamente, OB-OC *vs* C, P<0,05), sendo que o tratamento com osteocalcina não carboxilada foi capaz de reduzir a nível do grupo controle a expressão de *Osp* e *Ptprv*.



Figura 17- Conteúdo de mRNA de *Osp* (A), *Ptprv* (B) do fêmur de animais controle (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). Tecido obtido de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3-5 horas de restrição alimentar. Análise de mRNA feita por RT-qPCR. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 a 7 animais por grupo. \*P< 0.05,*vs* C #*P*<0,05, ##*P*<0,01 *vs* OB. ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

A expressão do gene *Bglap* (Figura 18) está reduzida no fêmur dos camundongos obesos (39%, OB vs C, P<0,05), de modo similar ao resultado encontrado de reduzido nível circulante de osteocalcina não carboxilada nos camundongos obesos (61%, OB vs C, P<0,05) (Tabela 4), porém mesmo que o tratamento com osteocalcina restabeleceu o nível plasmático de osteocalcina não carboxilada não se observou alteração na expressão de *Bglap* no fêmur dos camundongos obesos. Adicionalmente a expressão de *Bglap* no fêmur se relaciona negativamente com o peso corporal (Pearson r= -0,673, P<0,01) e com o peso do tecido adiposo branco (Pearson r= -0,5364, P<0,05).



Figura 18- Conteúdo de mRNA de *de Bglap* (A) do fêmur de animais controle (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). Tecido obtido de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3-5 horas de restrição alimentar. (A) Análise de mRNA feita por RT-qPCR. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 a 8 animais por grupo. \*P< 0.05 *vs* C, #*P*<0.05 *vs* OB, ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls. Correlação da expressão de *Bglap* no fêmur com o peso corporal (B) e com o peso do tecido adiposo branco periepididimal (C). Teste de correlação de Person

#### 4.10.2 Sinalização da insulina

No fêmur do grupo obeso a fosforilação da AKT (Figura 19) em resposta a estimulação à insulina esteve reduzida (40% *vs* C, P<0,05) e o tratamento com osteocalcina dos animais obesos recuperou esse quadro.



Figura 19-Relação do conteúdo proteína pAKT pelo conteúdo de AKT no fêmur de animais controle (C), obesos (OB) ou obesos tratados com osteocalcina não carboxilada por 28 dias (OB-OC). O fêmur foi coletado 120 segundos após a injeção de insulina (25 mU/g de peso corpóreo) na veia porta de animais com 23 semanas de idade, sacrificados após 3 a 5 horas de restrição alimentar. (A) Blots representativos. (B)Conteúdo da proteína pAKT/AKT total em unidades arbitrárias (UA) por  $\mu$ g de proteína aplicada no gel, os resultados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteínas do tecido. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 3 a 4 animais por grupo, \**P*<0,05 *vs* C, #*P*<0,05 *vs* OB ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls.

## 4.11 Avaliação da expressão de Gprc6a

O receptor putativo da osteocalcina é o GPRC6A. A análise do gene desse receptor, *Gprc6a*, indicou aausência da expressão deste gene no músculo esquelético, TAB periepididimal, fígado, e fêmur de camundongos controles. Adicionalmente, em linhagens celulares de adipócitos 3T3-L1 e de osteoblastos MC3T3-E1, não foi observada a expressão do gene *Gprc6a* (Figura 20).



**Figura 20– Expressão de** *Gprc6a* **em diversos tecidos e linhagens celulares.** A análise por RT-qPCR foi realizada com cDNA de múltiplas amostras de fêmur (n=7), osteoblastos MC3T3-E1 (n=4), tecido adiposo branco (n=8), adipócitos 3T3-L1 (n=11), músculo esquelético (n=7) e fígado (n=9) usando sequência de primes de *Gprc6a* [elaborados pela presente equipe (Gprc6a Guedes et al.)] (A), e, *Gprc6a* [elaborados por Otani et al. (Gprc6a Otani et al)] (B). (A) e (B) Produtos da RT-qPCR foram separados em gel de agarose. *Bact* e genes específicos de alguns tecidos e linhagens celulares foram utilizados como controle positivo (*Bglap, Adipoq, Slc2a4* e *Slc2a2*).

# 5 DISCUSSÃO

Nesse nosso estudo, utilizamos o modelo de obesidade por lesão hipotalâmica, induzida por injeções subcutâneas de glutamato monossódico (MSG) em camundongos neonatos. O glutamato monossódico, em solução tampão como o plasma, libera glutamato, um aminoácido neurotransmissor excitatório, que atua predominantemente no sistema nervoso central. O glutamato em excesso aumenta a condutância da membrana celular à íons, como o cálcio, gerando desequilíbrio iônico e consequentemente, exaustão das reservas energéticas celulares, ativação de DNAses, RNAses e proteinases; e, por fim, causando morte celular (KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1977; COYLE et al., 1981; BESANCON et al., 2008). A lesão neuronal causada pelo glutamato monossódico em camundongos neonatos ocorre devido ausência ou pouca formação da barreira hematoencefálica. Apesar da hipofagia ou normofagia a indução da obesidade está baseada na lesão de diversas estruturas na região circunventricular, principalmente o núcleo arqueado e parte do hipotálamo ventro-medial (KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1977). A obesidade ocasionada a partir destas lesões pode ser explicada por diversos fatores, tais como: deficiência de hormônio de crescimento, resultando em maior lipogênese (NEMEROFF et al., 1977; NAKAI et al., 1986; DOMINIQUE MAITER et al., 1991); menor atividade termogênica do tecido adiposo marrom (HIMMS-HAGEN, 1989); e, hipercorticosteronemia (NAKAJIMA et al., 1985; LORDEN; CAUDLE, 1986). Os animais obesos por MSG também podem ter crescimento anormal, hipogonadismo e esterilidade (OLNEY, 1969).

Adicionalmente, esses animais obesos são resistentes à insulina, hiperinsulinêmicos (MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1993; PAPA; SERAPHIM; MACHADO, 1997), e apresentam inflamação sistêmica e no tecido adiposo (FURUYA et al., 2010).

No presente trabalho, a eficiência na indução da obesidade segundo o modelo de obesidade por lesão hipotalâmica por injeções subcutâneas com MSG em camundongos neonatos foi verificada uma vez que, os animais obesos tratados ou não com osteocalcina, em relação ao grupo controle, apresentaram aumento do peso de tecido adiposo branco periepididimal e maior indíce de Lee, resultante do maior peso corporal e menor comprimento nasoanal. Interessantemente, o tratamento com osteocalcina resultou em redução do peso do TAB dos camundongos, o que está de acordo com outro estudo que demostrou que animais sob dieta hiperlipídica tratados com osteocalcina não carboxilada apresentaram redução do tecido adiposo (FERRON et al., 2012).

O modelo animal de obesidade utilizado mostrou-se claramente resistente à insulina, conforme esperado (FURUYA et al., 2010), com maiores níveis plasmáticos de frutosamina e insulinemia. Além disso, os testes *in vivo* demonstraram que esses animais obesos são resistentes à insulina. Interessantemente, o tratamento com osteocalcina foi efetivo em diminuir o quadro de resistência à ação da insulina sistemicamente estabelecido na obesidade, uma vez que os animais obesos tratados em relação aos não tratados, apresentaram maior valor de kITT, no teste de tolerância a insulina, redução da ativação da via gliconeogênica no teste de tolerância ao piruvato, e melhora do quadro de resistência à sinalização da insulina detectada pela recuperação do conteúdo de AKT fosforilada no tecido adiposo, no fígado e no fêmur dos camundongos obesos. A melhora da resistência à insulina já foi observada em outros estudos em animais sob dieta hiperlipídica tratados com osteocalcina não carboxilada (FERRON et al., 2008, 2012; ZHOU et al., 2013), porém pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos nesse fenômeno.

A proteína GLUT4, codificada pelo gene *Slc2a4*, está presente em células de músculo esquelético e tecido adiposo e é responsável pelo transporte de glicose estimulado por insulina. O conteúdo desse transportador é um fator limitante importante, e se encontra reduzido em estados de resistência à insulina (MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1992; MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1993; PAPA; SERAPHIM; MACHADO, 1997; FURUYA et al., 2010). Além disso, vários estudos sustentam que resistência à insulina está diretamente relacionada com a redução de *Slc2a4*/GLUT4. Nesse sentido, camundongos knockout para GLUT4 são hiperglicêmicos e resistentes à ação da insulina (STENBIT et al., 1997; ZISMAN et al., 2000), estudos em camundongos que superexpressam a proteína GLUT4 em adiposo demonstraram que há aumento da sensibilidade à insulina (SHEPHERD et al., 1993), e tratamentos que recuperam o conteúdo de GLUT4 melhoram a resistência à insulina sistêmica (PAPA; SERAPHIM; MACHADO, 1997; FURUYA; BINSACK; MACHADO, 2003; ZANQUETTA et al., 2000; POLETTO et al., 2015).

Dessa maneira a diminuição do conteúdo de mRNA de *Slc2a4* e da proteína GLUT4 em TAB verificada nos animais obesos, está de acordo com a literatura, uma vez que a obesidade se caracteriza por ser um estado de resistência à insulina, quadro em que tanto os níveis de expressão de *Slc2a4*, quanto o conteúdo de proteína GLUT4 estão diminuídos (MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1992; MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1993; PAPA; SERAPHIM; MACHADO, 1997; FURUYA et al., 2010). Por outro lado, o tratamento com osteocalcina, embora não tenha alterado a expressão de adiponectina, foi capaz de reverter parcialmente a redução da expressão gênica de *Sl2a4* e do conteúdo de GLUT4 em TAB de animais obesos,

sugerindo fortemente uma melhora da resistência à insulina, o que foi confirmado pelo aumento do conteúdo fosforilado de AKT no TAB.

Apesar do tratamento com osteocalcina não carboxilada reduzir o tamanho do tecido adiposo periepididimal e melhorar a resistência à insulina e a inflamação neste tecido, pela análise histológica percebeu-se que o tratamento não causou nenhuma alteração no tamanho dos adipócitos. Na progressão da obesidade é sugerido que o aumento do tecido adiposo inicialmente ocorre por aumento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e depois se tem um aumento no número de adipócitos (hiperplasia) (FAUST et al., 1978). O modelo de obesidade causada por lesão hipotalâmica através glutamato monossódico é um modelo de obesidade com progressão ao longo do tempo. Camundongos obesos com a mesma metodologia experimental e com quatro semanas a mais de idade (27 semanas) do que os do presente estudo (23 semanas), apesar de apresentarem o mesmo peso corporal dos animais do presente estudo têm aumento de 69% de massa gorda (YONAMINE et al., 2016). Sendo assim, podemos assumir que esses animais obesos apresentam uma obesidade que progride constantemente, e que possivelmente, o tratamento com osteocalcina reduziu a fase de hiperplasia, resultando em menor quantidade de TAB.

Os níveis plasmáticos de adiponectina, um hormônio derivado dos adipócitos, está reduzido na obesidade e no quadro de DM2 (ARITA et al., 1999; WEYER et al., 2001). O tratamento das células 3T3-L1 com osteocalcina não carboxilada resultou em aumento da expressão de *Adipoq*, o que está de acordo com a literatura (LEE et al., 2007). No entanto, o pré-tratamento com osteocalcina não foi efetivo em reverter o efeito deletério do TNF-a sobre a expressão de *Adipoq*, o que explicaria o resultado em animais, nos quais a osteocalcina não reverteu a diminuição da expressão de *Adipoq* nos camundongos obesos. É importante ressaltar que os animais obesos apresentam nível circulantes de TNF-a aumentado (FURUYA et al., 2010), bem como expressão de TNF-a aumentada no TAB, como observado no presente estudo.

A análise do músculo gastrocnêmio não permitiu melhores investigações da ação da osteocalcina não carboxilada sobre a resistência à insulina em território muscular, uma vez que a análise do conteúdo de proteína GLUT4 e de seu respectivo mRNA, *Slc2a4* nesse território não indicou diferença significativa entre os grupos estudados. Como discutido anteriormente, a redução na expressão de Slc2a4/GLUT4 em tecido adiposo branco e músculo é um indicativo de resistência. Além disso, diferentemente do observado nos animais de 23 semanas do presente estudo, um estudo de nosso laboratório mostra que camundongos obesos por MSG com 27 semanas de idade são diabéticos e apresentam reduzido conteúdo de GLUT4 no músculo esquelético (YONAMINE et al., 2016), indicando que a resistência à insulina na obesidade e o diabetes tipo 2 são de progressão temporal e tecido-específicos (PARK et al, 2005; JELENIK et al, 2014).

A proteína GLUT2 é um transportador de glicose de alta capacidade presente no fígado capaz de transportar glicose de forma bi-direcional, permitindo o influxo de glicose no período pós-prandial e o efluxo deste substrato nos períodos pós-absortivo e jejum. Em modelo animal de diabetes e/ou obesidade, a expressão do gene *Slc2a2*, que codifica para GLUT2, aumenta no território hepático (YAMAMOTO et al., 1991; SEINO; YAMAMOTO; KOH, 1992; SLIEKER et al., 1992), o que corrobora com os resultados encontrados para os camundongos obesos. Entretanto, o tratamento com osteocalcina não alterou a expressão do gene *Slc2a2*, e nem o conteúdo da proteína GLUT2.

No sentido de estudar o acúmulo de gordura nas células hepáticas, quadro caracterizado como esteatose hepática ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) foram investigadas as expressões de *Cpt1a*, *Pck1*, *G6pc*, *Dgat1*, *e Srebf1 isoforma c*. O gene *Cpt1* codifica uma proteína envolvida na lipólise, a carnitina palmitoil transferase, e o gene *Pck1*, codifica a proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinase; ambas proteínas possuem função chave no controle da velocidade da via gliconeogênica. A expressão dos genes *Cpt1* e *Pck1* se manteve inalterada entre os grupos estudados não permitindo assim investigar a atuação destes genes.

Já foi relatado que a glicose-6-fosfatase está reduzida em pacientes com esteatose hepática (KONOPELSKA; KIENITZ; QUINKLER, 2011) Da mesma forma, foi observado que em ambos grupos obesos, tratado e não tratado, houve redução no conteúdo gênico dessa enzima.

A enzima DGAT1, codificada pelo gene *Dgat1*, está envolvida na lipogênese realizando a conversão de triaciglicerol e acil-CoA em triglicérides. Já foi demonstrado que essa enzima contribui para esteatose hepática através da esterificação de ácidos graxos exógenos (VILLANUEVA et al., 2009), o que poderia explicar a maior expressão de *Dgat1* no fígado de ambos grupos obesos.

A proteína SREBP-1C, codificada pelo gene *Srebf1 isoforma c*, por regular a transcrição de genes relacionados à lipogênese (HORTON, 2002), atua no fígado aumentando a síntese de ácidos graxos *de novo*, além também de encontrar-se mais expressa em animais obesos (SHIMOMURA et al., 2000). Já foi relatado que animais sob dieta hiperlipídica tratados com osteocalcina não carboxilada apresentam menor tendência à esteatose hepática (ZHOU et al., 2013), e que a inibição da expressão de *Srebf1 isoforma c* reverte este quadro (FREDERICO et al., 2011). Portanto, a redução significativa da expressão de *Srebf1 isoforma c* nos obesos tratados com osteocalcina sugere uma possível prevenção de esteatose, a qual não foi confirmada pela análise histológica e nem pelos resultados obtidos *in vitro*(Anexo1). A redução do conteúdo gênico de *Srebf1 isoforma c* após o tratamento com osteocalcina sugere que o fenômeno benéfico da osteocalcina sobre a esteatose possa ser observado em diferentes dose e/ou tempo de tratamento utilizadas no presente protocolo.

Como já destacado a obesidade está relacionada a um estado de inflamação subclínico em que os tecidos adiposo e hepático são órgãos que participam ativamente na produção de marcadores inflamatórios (DO PRADO et al., 2009). O gene Ccl2 codifica a proteína CCL2, também conhecida por proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), um importante fator quimiotático para monócitos. Já os genes Il1b e Il6, codificam respectivamente as interleucinas IL-1 beta e IL-6. A IL-1 beta é uma interleucina secretada por macrófagos, monócitos e linfócitos B e está relacionada resposta inflamatória e a coativação, estimulação, proliferação e maturação de células envolvidas na regulação de respostas imunes. IL-6 é uma interleucina secretada pelo endotélio, por macrófago, linfócitos T auxiliares tipo 2 e linfócitos B, e está envolvida na indução de reação de fase aguda, diferenciação celular e inflamação (ABBAS ABUL K.; LICHTMAN;; PILLAI, 2012; CONTASSOT; BEER; FRENCH, 2012). Os genes Nlrp3 e Casp1 codificam respectivamente as proteínas NLRP3 e CASP1 (caspase1), que são proteínas que fazem parte de um complexo proteico oligomérico da resposta imune inata denominado de inflamassomo. Esse complexo é ativado por diferentes por sinais inflamatório e a sua função está relacionada com a ativação de processos inflamatórios e maturação de citocinas inflamatórias como IL-1 beta e IL18. (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). A ativação da maquinaria do inflamassomo está relacionado com a inflamação e resistência à insulina induzida pela obesidade (VANDANMAGSAR et al., 2011).

Como já destacado, o TAB, tem um papel fundamental no contexto inflamatório na obesidade (DO PRADO et al., 2009). Nesse sentido, nossos resultados demonstram que os animais obesos apresentam inflamação no tecido adiposo. Entretanto, a osteocalcina se mostrou eficaz em reduzir, no tecido adiposo branco, os focos inflamatórios caracterizados pelas coroas de macrófagos, bem como reduzir também a expressão de todos os fatores inflamatórios analisados, indicando menor quadro inflamatório neste tecido, e possivelmente menor ativação da via do NFKB. Uma vez que a via NFKB interfere diretamente na sinalização da insulina (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006) e modula negativamente a expressão do *Slc2a4* (FURUYA et al., 2012), fazendo assim um elo entre resistência à insulina e inflamação, é muito provável a participação dessa via na ação da osteocalcina sobre a resistência à insulina nesse tecido, uma vez que, como verificado no modelo *in vitro*, o pré-tratamento com osteocalcina diminuiu de forma significativa o conteúdo da subunidade de p65 do complexo NFKB no núcleo de adipócitos 3T3-L1 quando estimulados com TNF-a.

Em relação à inflamação no fígado, o aumento da expressão de *Tnfa* no grupo obeso, e a redução da expressão dessa citocina após o tratamento com osteocalcina corrobora com o descrito na literatura (CAI et al., 2005; FERRON et al., 2012; ZHOU et al., 2013).

A ligação do RANKL, uma proteína da membrana plasmática, ao RANK, que é um receptor na membrana do osteoclasto, favorece a sinalização para que ocorra a reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG), codificada pelo gene *Opg*, é uma proteína que impede a ligação do RANKL ao RANK o que resulta em inibição da reabsorção óssea. A sinalização da insulina em osteoclasto inibe a expressão de *Opg* e favorece a diferenciação dos osteoclastos (FERRON et al., 2010), aumentando assim a reabsorção óssea, em cujo processo há redução de pH local, o que favorece a descarboxilação da osteocalcina fora da célula (FERRON et al., 2010; WEI et al., 2014).

*Ptprv*, também conhecido com *Esp*, codifica para a proteína fosfatase óssea, que interefere na sinalização à insulina no osso. Animais knockout para *Esp* são protegidos contra a obesidade e intolerância à glicose (LEE et al., 2007).

Nossos dados mostram que a osteocalcina não apenas reduz a expressão dos genes *Ptprv* e *Opg*, mas também aumenta a fosforilação da proteína AKT no fêmur de animais obesos, o que fortemente sugere que a osteocalcina contribui para a melhora da resistência à insulina no osso. A melhora da resistência à insulina nesse tecido favorece a descarboxilação da osteocalcina da matriz óssea, a qual é secretada na corrente sanguínea e atuará nos tecidos periféricos como hormônio, agindo sobre o metabolismo de glicose e como agente anti-inflamatório, conforme mostraram os resultados do presente trabalho.

# 6 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 hormonio 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*.

# 7 REFERÊNCIAS

ABBAS ABUL K.; LICHTMAN;, A. H.; PILLAI, S. Imunologia Celular e MolecularImunologia Celular e Molecular, 2012. .

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.

ARITA, Y.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; TAKAHASHI, M.; MAEDA, K.; MIYAGAWA, J. I.; HOTTA, K.; SHIMOMURA, I.; NAKAMURA, T.; MIYAOKA, K.; KURIYAMA, H.; NISHIDA, M.; YAMASHITA, S.; OKUBO, K.; MATSUBARA, K.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1999.

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

BESANCON, E.; GUO, S.; LOK, J.; TYMIANSKI, M.; LO, E. H. **Beyond NMDA and AMPA** glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in strokeTrends in Pharmacological Sciences, 2008.

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- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. **Nature Medicine**, 2005.

CONTASSOT, E.; BEER, H. D.; FRENCH, L. E. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skinSwiss Medical Weekly, 2012.

COYLE, J. T.; BIRD, S. J.; EVANS, R. H.; GULLEY, R. L.; NADLER, J. V; NICKLAS, W. J.; OLNEY, J. W. Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity, and mechanisms of action. Based on an NRP one-day conference held June 30, 1980. **Neurosciences Research Program bulletin**, v. 19, n. 4, p. 1–427, 1981. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6116209">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6116209</a>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

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.

DOMINIQUE MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MARTIN, J. B.; KOENIG, J. I. Neonatal Treatment with Monosodium Glutamate: Effects of Prolonged Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone Deficiency on Pulsatile GH Secretion and Growth in Female Rats\*. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 1100–1106, fev. 1991. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1989848">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1989848</a>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

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 implicationsHepatology, 2010.

FAUST, I. M.; JOHNSON, P. R.; STERN, J. S.; HIRSCH, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. **The American journal of physiology**, 1978.

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.

FREDERICO, M. J. S.; VITTO, M. F.; CESCONETTO, P. A.; ENGELMANN, J.; DE SOUZA, D. R.; LUZ, G.; PINHO, R. A.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T. Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 2011.

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.; BINSACK, R.; MACHADO, U. F. Low ethanol consumption increases insulin sensitivity in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2003.

FURUYA, D. T.; NERI, E. A.; POLETTO, A. C.; ANHÊ, G. F.; FREITAS, H. S.;

CAMPELLO, R. S.; REBOUÇAS, N. A.; MACHADO, U. F. Identification of nuclear factorκB sites in the Slc2a4 gene promoter. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2013.

FURUYA, D. T.; POLETTO, 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.

FURUYA, D. T.; POLETTO, A. C.; FREITAS, H. S.; MACHADO, U. F. Inhibition of cannabinoid CB1 receptor upregulates Slc2a4 expression via nuclear factor-??B and sterol regulatory element-binding protein-1 in adipocytes. **Journal of Molecular Endocrinology**, 2012.

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: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2664828">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2664828</a>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

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

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesityProgress in Lipid Research, 1989. .

HORTON, J. D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. **Biochemical Society transactions**, 2002.

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

osteocalcinMolecular 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.

KIZER, J. S.; NEMEROFF, C. B.; YOUNGBLOOD, W. W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacological reviews**, v. 29, n. 4, p. 301–18, dez. 1977. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/364498">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/364498</a>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

KONOPELSKA, S.; KIENITZ, T.; QUINKLER, M. Downregulation of hepatic glucose-6-phosphatase- $\alpha$  in patients with hepatic steatosis. **Obesity**, 2011.

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.

LORDEN, J. F.; CAUDLE, A. Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. **Neurobehavioral Toxicology & Teratology**, 1986.

MACHADO, U. F.; SHIMIZU, Y.; SAITO, M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. **Hormone and Metabolic Research**, 1993.

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.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . **Molecular Cell**, 2002.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Bioquímica básica. 3. ed. Parte 3 Sessão 14. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

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 posttranslational modification: Vitamin K-dependent carboxylation of a peptide substrate. **Journal of Biological Chemistry**, 1995.

NAKAI, T.; TAMAI, T.; TAKAI, H.; HAYASHI, S.; FUJIWARA, R.; MIYABO, S. Decreased ketonaemia in the monosodium glutamate-induced obese rats. Life Sciences, 1986.

NAKAJIMA, H.; TOCHINO, Y.; FUJINO-KURIHARA, H.; YAMADA, K.; GOMI, M.; TAJIMA, K.; KANAYA, T.; MIYAZAKI, A.; MIYAGAWA, J.; HANAFUSA, T. Decreased incidence of diabetes mellitus by monosodium glutamate in the non-obese diabetic (NOD) mouse. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, 1985.

NEMEROFF, C. B.; GRANT, L. D.; BISSETTE, G.; ERVIN, G. N.; HARRELL, L. E.; PRANGE, A. J. Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. **Psychoneuroendocrinology**, 1977.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, 1969.

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.

PAPA, P. C.; SERAPHIM, P. M.; MACHADO, U. F. Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. **International Journal of Obesity**, 1997.

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

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK functionNature 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 ??-cells in vitro and pancreas in vivo. Journal of Bone and Mineral Research, 2011.

POLETTO, A. C.; DAVID-SILVA, A.; YAMAMOTO, A. P. D. M.; MACHADO, U. F.; FURUYA, D. T. Reduced Slc2a4/GLUT4 expression in subcutaneous adipose tissue of monosodium glutamate obese mice is recovered after atorvastatin treatment. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, 2015.

PUCHACZ, E.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S.; WOZNEY, J.; HUEBNER, K.; CROCE, C. Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. **Endocrinology**, 1989. ROGERS, P.; WEBB, G. P. Estimation of body fat in normal and obese mice. **The British journal of nutrition**, 1980.

SEINO, Y.; YAMAMOTO, T.; KOH, G. Insulin and glucose transporter gene expression in obesity and diabetes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 200, n. 2, p. 210–3, jun. 1992. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579585">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579585</a>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

SHEPHERD, P. R.; GNUDI, L.; TOZZO, E.; YANG, H.; LEACH, F.; KAHN, B. B. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, 1993.

SHIMOMURA, I.; MATSUDA, M.; HAMMER, R. E.; BASHMAKOV, Y.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Molecular Cell**, 2000. SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, 2006.

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.

SLIEKER, L. J.; SUNDELL, K. L.; HEATH, W. F.; OSBORNE, H. E.; BUE, J.; MANETTA, J.; SPORTSMAN, J. R. Glucose transporter levels in tissues of spontaneously diabetic Zucker fa/fa rat (ZDF/drt) and viable yellow mouse (A(vy)/a). **Diabetes**, 1992.

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

VANDANMAGSAR, B.; YOUM, Y. H.; RAVUSSIN, A.; GALGANI, J. E.; STADLER, K.; MYNATT, R. L.; RAVUSSIN, E.; STEPHENS, J. M.; DIXIT, V. D. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, 2011.

VILLANUEVA, C. J.; MONETTI, M.; SHIH, M.; ZHOU, P.; WATKINS, S. M.; BHANOT, S.; FARESE, R. V. Specific role for acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids. **Hepatology**, 2009.

WEI, J.; FERRON, M.; CLARKE, C. J.; HANNUN, Y. A.; JIANG, H.; BLANER, W. S.; KARSENTY, G. Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation. **Journal of Clinical Investigation**, 2014.

WEYER, C.; FUNAHASHI, T.; TANAKA, S.; HOTTA, K.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R. E.; TATARANNI, P. a. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 2001.

YAMAMOTO, T.; FUKUMOTO, H.; KOH, G.; YANO, H.; YASUDA, K.; MASUDA, K.; IKEDA, H.; IMURA, H.; SEINO, Y. Liver and muscle-fat type glucose transporter gene expression in obese and diabetic rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 175, n. 3, p. 995–1002, 29 mar. 1991. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025268">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025268</a>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

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.

YONAMINE, C. Y.; PINHEIRO-MACHADO, E.; MICHALANI, M. L.; FREITAS, H. S.; OKAMOTO, M. M.; CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; MACHADO, U. F. Resveratrol improves glycemic control in insulin-treated diabetic rats: Participation of the hepatic territory. **Nutrition and Metabolism**, 2016.

ZANQUETTA, M. M.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U. F. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. **Journal of Pineal Research**, 2003.

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-kb signaling pathway. **Endocrinology**, 2013.

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

# 8 ANEXO 1- CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE ESTEATOSE HEPATOCELULAR UTILIZANDO HEPA1C1C7

Hepatócitos de camundongo da linhagem hepa1c1c7 (BCRJ) foram mantidas em meio de cultura DMEM (Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para induzir esteatose hepatocelular, células em 75% de confluência foram expostas por 24 h ao meio de cultura DMEM suplementado com 1% albumina bovina sérica (BSA), denominado de meio de tratamento, e a diferentes concentrações de palmitato. O palmitato foi solubilizado em NaOH 0,1 M conjugado com 10% de albumina bovina sérica (BSA) (Kohli et al., 2007).



**Figura 21- Esteatose hepatocelular induzida por palmitato.** Hepatócitos murinos Hepa-1c1c7, sem regime de restrição, foram induzidos com palmitato a 0 (A), 0,1 (B) ou 0,2 (C), 0,3 (D) mM por 24 horas. Após esse período, as placas de cultura foram fixadas com formaldeído a 4%, seguido de coloração com Oil Red. Os resultados foram normalizados de forma ao grupo controle corresponder o valor 100. Teste T de student entre cada grupo com o controle com n de 3. \*\*\* P<0,001 *vs* C



**Figura 22-Esteatose hepatocelular induzida por palmitato.** Hepatócitos murinos Hepa-1c1c7 foram induzidos com palmitato a 0 (C), 0,1 (P0,1) ou 0,2 (P0,2), 0,3 (P0,3) mM por 24 horas Após esse período, as placas de cultura foram fixadas com formaldeído a 4%, seguida da leitura de absorção da coloração por Oil Red (A). A viabilidade celular (B) foi analisada pelo método baseado na atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, que é capaz de metabolizar o reagente MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) em um composto denominado formazan. Os resultados foram normalizados de forma ao grupo controle corresponder o valor 100. \*\*\* P<0,001 vs C (A) e  $\mu m P<0,001 vs C$  (B). Teste t de student entre cada grupo com o controle com n três experimentos independentes.

A análise da indução de esteatose hepatocelular foi feita a partir da absorbância obtida pela coloração de Oil Red (Figura 22-A) e da dosagem de triglicérides (Figura 23-A). A avaliação de dose e tempo de tratamento com palmitato juntamente com o ensaio de viabilidade (Figura 22-B) permitiu analisar que a concentração de palmitato de 0,2 mM seria a mais efetiva para induzir a esteatose hepatocelular, uma vez que não houve diferença na dosagem de triglicérides entre o grupo P0,1 mM e o grupo controle e que a concentração de 0,3 mM de palmitato reduziu a viabilidade celular em 36% em relação ao grupo controle, porém o tratamento do grupo P0,2 mM com 10, 20, e 40 ng/mL de osteocalcina não carboxilada por
24h não induziu nenhuma alteração ao dosagem de triglicérides do grupo tratado com palmitato de 0,2 mM.



**Figura 23-Dosagem de triglicérides de esteatose hepatocelular induzida por palmitato.** Hepatócitos murinos Hepa-1c1c7 foram induzidos com palmitato a 0 (C), 0,1 (P0,1) ou 0,2 (P0,2), 0,3 (P0,3) mM por 24 horas, e após a indução com palmitato 0,2 mM por 24 horas posteriormente houve tratamento do grupo P0,2 mM com 10 ng/mL (P0,2-10), 20 ng/mL (P0,2-20) e 40 ng/mL (P0,2-40) de osteocalcina não carboxilada por 24h. \*\* P<0,01 *vs* C \*\*\* P<0,001 *vs* C Teste t de student

# 9 ANEXO 2- ARTIGO- OSTEOCALCIN IMPROVES INSULIN RESISTANCE AND INFLAMMATION IN OBESE MICE: PARTICIPATION OF WHITE ADIPOSE TISSUE AND BONE

#### Bone xxx (2017) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

### Bone





journal homepage: www.elsevier.com/locate/bone

### Full Length Article

### Osteocalcin improves insulin resistance and inflammation in obese mice: Participation of white adipose tissue and bone<sup>\*</sup>

### J.A.C. Guedes <sup>a</sup>, J.V. Esteves <sup>a</sup>, M.R. Morais <sup>b</sup>, T.M. Zorn <sup>b</sup>, D.T. Furuya <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 28 July 2017 Revised 21 November 2017 Accepted 23 November 2017 Available online xxxx

Keywords: Osteocalcin Insulin resistance GLUT4 Inflammation Obesity Adipose tissue Bone

### ABSTRACT

*Aims/hypothesis:* The discovery of osteocalcin, a protein synthetized 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.

*Methods and results*: Lean control, saline-treated obese and uncarboxylated osteocalcin (uOC)-treated obese mice were subjected to insulin tolerance test *in vivo*. Blood was collect for biochemical/metabolic profile analysis; and, 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 (1) WAT weight reduction; (2) upregulation of glucose transporter (GLUT) 4 protein and its mRNA (*Slc2a4*); (3) improved insulin-induced AKT phosphorylation; (4) downregulation of several genes involved in inflammation and inflammassome transcriptional machinery, and (5) 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-a challenge; moreover, osteocalcin treatment increased AKT phosphorylation induced by insulin. 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.

*Conclusion:* 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; and, in bone, osteocalcin increases the secretion of uncarboxylated osteocalcin by improving insulin resistance.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: CLS, crown-like structures; T2DM, type 2 diabetes mellitus; ECM, extracellular matrix; HFD, high-fat diet; ITT, insulin tolerance test; kITT, rate constant for disappearance of glucose; IR, insulin resistance; MSG, monosodium glutamate; uOC, uncarboxylated osteocalcin; WAT, white adipose tissue.

\* Acronyms for genes and proteins names: Acronyms used for genes and proteins were based on Mouse Genome Informatics and Universal Protein Resource (UniProt), respectively. Genes: Actb, beta actin; Adipoq, adiponectin, C1Q and collagen domain containing; Bglap, bone gamma carboxyglutamate protein; Casp1, caspase 1; Ccl2, chemokine (C-C motif) ligand 2; Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Ggcx, gamma-glutamyl carboxylase (or, vitamin K-dependent carboxylase); Il1b, interleukin 1 beta; Il6, interleukin 6; NIrp3, NLR family, pyrin domain containing 3; Opg, osteoprotegerin (or, tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b; Ptprv, protein tyrosine phosphatase, receptor type, V; Rplp0, ribosomal protein large P0 (or 36B4); Slc2a2, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2; Slc2a4, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4; Srebf1, sterol regulatory element binding transcription factor 1; Tnf, tumor necrosis factor; Vkorc1, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. Proteins: AKT, RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; GLUT4, solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4; NFKB, nuclear factor NF-kappa-B (indiscriminate isoform), OST-PTP, osteotesticular protein tyrosine phosphatas; RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (or, tumor necrosis factor.

\* Corresponding author at: Dept. of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1524, 05508-900 São Paulo, Brazil. *E-mail address:* danifuruya@yahoo.com (D.T. Furuya).

https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.11.020 8756-3282/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx

### 1. Introduction

Osteocalcin (bone Gla protein) is synthesized as a pre-pro-protein by osteoblasts, and suffers two post-translational modifications. The first modification is mediated by two enzymes, such as vitamin K-dependent gamma-carboxylase (also named gamma-glutamyl carboxylase) and vitamin K epoxide reductase, in endoplasmatic reticulum. As a result of the  $\gamma$ -carboxylation process, 3 glutamic acid (Glu) residues are transformed into  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla) residues, which are essential for osteocalcin to attract Ca<sup>+2</sup> and incorporate it into hydroxyapatite crystals in the extracellular matrix (ECM) [4]. Next, carboxylated osteocalcin is transported to Golgi complex, where the propeptide sequence is removed; and after that, it is secreted to ECM, finally reaching the bloodstream. Despite that, in the ECM, osteocalcin can undergo the second post-translational modification characterized by decarboxylation in the low pH of the resorption lacuna during bone resorption [15]. Thus, besides carboxylated osteocalcin, undercarboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin are secreted into circulation. Because uncarboxylated osteocalcin (uOC) is known to act as a hormone [30], bone has been no longer considered merely an structure for support and protection but it is now recognized as an endocrine organ. Since this fascinating discovery, novel investigations have been conducted.

Obesity is characterized as a state of insulin resistance (IR) and low grade inflammation, and is associated with several comorbidities [45,48]. Mice lacking osteocalcin have increased IR [30], and uOC treatment is found to improve IR of high-fat diet (HFD) obese mice [16]. The molecular basis of uOC on glucose metabolism is a vast field to be explored since few data is available. Considering that reducing inflammation can ameliorate whole-body IR [17,48], and that adipose tissue plays an important role in IR and inflammation in obesity [17,25,48], here we investigated the molecular mechanisms behind the effects of uOC on inflammation and IR in 3T3-L1 adipocytes challenged with tumor necrosis factor (TNF-a) and in adipose tissue of monosodium glutamate (MSG)-induced obese mice, a model of obesity, IR and inflammation [17]. In addition, since IR has been recently reported in bones [55], we also addressed whether MSG-induced obesity could contribute to inflammation and IR in bone. And if this is the case, we will then address whether uOC treatment has any effect on bone inflammation or IR.

#### 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The mouse preadipocyte 3T3-L1 and preosteoblast MC3T3-E1 subclone 14 cell lines were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Vitrocell Embriolife (Campinas, SP, Brazil). Alpha minimum essential medium (alpha MEM) with ribonucleosides and deoxyribonucleosides (M0644), bovine serum albumin (BSA, A7906), sodium pyruvate (P2256), penicillin/streptomycin, PS (P0781), Alizarin Red S stain (A5533), and monosodium glutamate (MSG, G1626) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). For 3T3-L1 differentiation, dexamethasone (D1159), 3isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, I5879) and insulin (I6634); and, for MC3T3-E1 differentiation,  $\beta$ -glycerophosphate (G9422) and sodium ascorbate (A4034) were purchased from Sigma-Aldrich. TNFa (GF046) was from Millipore (Temecula, CA, USA). Insulin (Humulin-R) for in vivo insulin tolerance test and insulin signaling was purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN, EUA), sodium thiopental from Cristália (Itapira, SP, Brazil) and osmotic pump (model 2004) from Alzet (Cupertino, CA, EUA). Kinetic-colorimetric assay for frutosamine and enzymatic-colorimetric assay for glucose was from Labtest (Lagoa Santa, MG, Brazil). Enzyme linked immunosorbent assay for mouse insulin kit (EZRMI-13K) was purchased from Millipore and enzyme immune assay for mouse Gluosteocalcin kit from Takara Bio (Shiga, Japan). The following antibodies, anti-GLUT4 (07-1404) was from Millipore, anti-p65 (Ab7970) from Abcam (Cambridge, MA, USA), anti-phospho-AKT1/2/3 (Ser 473, sc-7985-R) and anti-AKT (H-136, sc8312) from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA), and horseradish peroxidase-linked anti-rabbit immunoglobulin from GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Trizol was obtained from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), Improm-II reverse transcription system from Promega (Madison, WI, USA), and PowerUp SYBR Green Master Mix from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

#### 2.2. Animals

Hypothalamic obesity was induced in newborn male mice (CD1) by MSG injections (s.c.) on the first five days (2 mg/g b.w.), and on the seventh day after birth (4 mg/g b.w.) [17,44]. Despite hypophagia [10,17, 34,37] or normophagia [2,33], MSG mice display obesity which could be a consequence of several factors such as: (1) growth hormone deficiency [35,38,40]; (2) reduced thermogenic activity of brown adipose tissue [21]; and/or, (3) hypercorticosteronemia [34,39]. Besides obesity, MSG mice is a model of whole-body IR and inflammation [17,44]. Nineteen-week-old mice were divided into 3 groups: lean control (CTL), saline-treated obese (OB) and uncarboxylated osteocalcintreated obese (OB-OC) mice. Continuous infusion of saline solution (vehicle) or uOC was performed for 4 weeks by implantation (s.c.) of osmotic minipump (3 ng/h delivery) [14]. The amino acid sequence of mouse uOC was as follows: Tyr-Leu-Gly-Ala-Ser-Val-Pro-Ser-Pro-Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Thr-Arg-Glu-Gln-Cys-Glu-Leu-Asn-Pro-Ala-Cys-Asp-Glu-Leu-Ser-Asp-Gln-Tyr-Gly-Leu-Lys-Thr-Ala-Tyr-Lys-Arg-Ile-Tyr-Gly-Ile-Thr-Ile (US Biological, MA, USA). Animals were given ad libitum access to standard chow and water before and during the treatment. At the end of treatment, mice were food deprived for 4 h and insulin tolerance test in vivo was performed in non-anesthetized animals to evaluate IR. After insulin injection (0.75 U/kg b.w., s.c.), tail vein blood samples were collected (0, 5, 10, 15, 20, 30 min) and glycemia was determined with a glucometer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The corresponding values from 5 to 30 min were used to calculate rate constant for the disappearance of glucose (kITT) [5]. After 3 days of recovery, animals were food deprived for 4 h and periepididymal white adipose tissue (WAT), gastrocnemius skeletal muscle, femur and blood samples (cardiac puncture) were collected from anesthetized animals (50 mg/kg b.w. sodium pentobarbital, *i.p.*). Obesity degree was estimated by Lee obesity index [44]. For insulin signaling assessment, WAT was collected from anesthetized animals (sodium pentobarbital) before and after 90 s of 25 mU/g b.w. insulin injection in portal vein. To avoid excessive bleeding to death, femur was not collected before, but only after 120 s of 25 mU/g b.w. insulin injection in portal vein. The experimental protocol was approved by Ethical Committee for Animal Research of the Institute of Biomedical Sciences from University of São Paulo (131/2015, 2/2016).

### 2.3. Cell culture

3T3-L1 were propagated and differentiated according to the protocol described earlier [19]. Briefly, cells were grown to confluence in growth medium (DMEM, 10% FBS and 1% PS). Two days after confluence (day 2), cells were induced with differentiation medium I (DMEM, 10% FBS, 10  $\mu$ g/mL insulin, 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX, and 1% PS) for 2 days. Then on days 4 and 6, the medium was replaced with differentiation medium II (DMEM, 10% FBS, 5  $\mu$ g/mL insulin, 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX, and 1% PS). After this period (day 8), cells were

#### J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx

switched back to growth medium. Prior to treatment (day 9), cells were starved for 18 to 20 h in treatment medium (DMEM, 0.02% BSA, and 1% PS). The differentiated cells were submitted to 3 different treatments (day 10): 1) 20 ng/mL uOC alone for 24 h; 2) 20 ng/mL TNF-a alone for 24 h, or 3) pretreatment with 20 ng/mL uOC for 6 h, followed by 20 ng/mL TNF for 18 h. For insulin signaling assessment, nontreated or uOC-treated (24 h, 20 ng/mL) cells were incubated (stimulated) or not (basal) with 100 nM insulin for 5 min.

MC3T3-E1 cells were propagated in growth medium (alpha MEM, 1 mM sodium pyruvate, 10% FBS and 1% PS). After reaching confluence, cells were cultured in osteogenic medium (growth medium supplemented with 50 µg/mL ascorbic acid and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate) [52] for 14 or 21 days. To visualize mineralized nodules, cells were fixed in formalin (10%) and stained with Alizarin Red S staining solution [2% (w/v), pH 4.1 to 4.3].

### 2.4. Western blotting analysis

GLUT4, pAKT and AKT protein content was analyzed by Western blotting as previously described [44]. For NFKB p65 subunit analysis, nuclear protein was extract as described earlier [19]. Reversible ponceau staining was performed as protein loading control [53].

### 2.5. Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from tissues and cells with Trizol and reverse transcribed. qPCR was performed using Powerup SYBR Green on StepOne device (Applied Biosystems, Foster City, CA). The stability of several reference genes, such as mouse beta actin (*Actb*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), and ribosomal protein large P0 (*Rplp0*), were tested with RefFinder, a web-based tool. Among these genes, the most stable was *Actb* which was selected for normalization in samples of adipose tissue, femur, skeletal muscle and 3T3-L1 cells; and, *Rplp0*, for MC3T3-E1 cells. The primer sequences of mouse genes are as described in Table 1.

### 2.6. Morphological analysis

Hematoxylin and eosin for histomorphometrical analysis of WAT was performed as described [17].

### 2.7. Statistical analysis

All data are reported as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman–Keuls as *post hoc* test. When applicable, Student's *t*-test or Pearson's correlation were used.

#### 3. Results

#### 3.1. uOC ameliorates whole-body IR

To address the mechanisms of action of uOC in IR, obese mice were treated by continuous infusion with uOC for 4 weeks. The body measurements and biochemical/metabolic profile are show in Table 2. Food and water ingestion did not change among groups before or during the treatment. As expected, OB mice had increased body weight (26%, P < 0.001 vs CTL), Lee Obesity Index (11%, P < 0.001 vs CTL), WAT weight (65%, P < 0.001 vs CTL), plasma insulin (5.7-fold, P < 0.05 vs CTL), and fructosamine (35%, P < 0.05 vs CTL), but not plasma glucose when compared to CTL (Table 2). Furthermore, OB mice developed IR as measured by reduction of kITT in ITT when compared to CTL (66%, P < 0.001 vs CTL, Table 2). Of note, uOC treatment resulted in reduced WAT weight (17%, P < 0.05 vs OB) but not in loss of body weight when compared to OB mice. Moreover, uOC treatment did not reduce significantly the plasma insulin or fructosamine levels, but it significantly ameliorated whole-body IR when compared to OB mice (2.3-fold, P < 0.05 vs OB, Table 2).

### 3.2. uOC reduces IR and inflammation in adipose tissue

To investigate the mechanisms of the beneficial effect of uOC in obesity and IR, we first assessed the expression of the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle and WAT. It is well known that the downregulation of GLUT4 and its mRNA, the solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4, Slc2a4, is a hallmark of IR [17,20,41]. The expression of either GLUT4 protein (Fig. 1B) or its gene, Slc2a4 (Fig. 1A), showed no change in skeletal muscle of OB mice when compared to CTL mice, pointing out that IR had not yet developed in that tissue. Conversely, WAT of OB mice showed reduced expression of GLUT4 protein (60%, P<0.001 vs CTL, Fig. 1D), Slc2a4 (89%, P < 0.001 vs CTL, Fig. 1C) and adiponectin gene, Adipoq (85%, P < 0.001 vsCTL, Fig. 1E), besides reduced AKT phosphorylation in response to insulin stimulation (48% vs stimulated CTL, P < 0.05, Fig. 1F); notably, uOC treatment was able to recover significantly GLUT4 protein (Fig. 1D), and Slc2a4 gene (Fig. 1C) expression, besides insulin-induced AKT phosphorylation (Fig. 1F), but did not exert any effect on Adipog expression (Fig. 1E).

Considering that obesity is a subchronic state of inflammation and that anti-inflammatory treatments can improve IR [17,25,48], we next investigated the effect of uOC in adipose tissue inflammation. As reported earlier [17], visceral WAT of OB mice showed a substantial upregulation of the expression of genes involved in inflammation, including tumor necrosis factor, Tnf (6.1-fold, P<0.001 vs CTL, Fig. 2A), interleukin 1 beta, *ll1b* (81.5-fold, P < 0.001 vs CTL, Fig. 2B), interleukin 6, *ll6* (15.4fold, *P* < 0.001 vs CTL, Fig. 2C), and chemokine (C-C motif) ligand, *Ccl2* (4.8-fold, P<0.001 vs OB, Fig. 2D). Additionally, WAT of OB mice showed increased expression of inflammasome transcriptional machinery, including caspase 1, Casp1 (3.3-fold, P < 0.001 vs CTL, Fig. 2E) and NLR family, pyrin domain containing 3, Nlrp3 (7.3-fold, P < 0.01 vs CTL, Fig. 2F) genes. Interestingly, uOC treatment, in visceral fat depot of OB mice, reduced substantially the expression of proinflammatory cytokines, chemokine, and inflammasome-related genes, including the following: Tnf (2.4-fold, P < 0.05 vs OB, Fig. 2A), Il1b (20.1-fold, P < 0.001 vs OB, Fig. 2B), Il6 (3.1-fold, P < 0.001 vs OB, Fig. 2C), Ccl2 (2.1-fold, P < 0.001 vs OB, Fig. 2D), Casp1 (29%, P < 0.05 vs OB, Fig. 2E), and Nlrp3 (42%, P < 0.05 vs OB, Fig. 2F). Finally, consistent with previous report [17], histological analysis of WAT from OB mice revealed the presence of diffuse infiltration of lymphocytes, fibrosis and macrophage in crown-like structures (CLS) (Fig. 2H). Of note, uOC treatment prevented infiltration of lymphocytes and fibrosis, and reduced the density of macrophage in CLS (Fig. 2I); however, uOC did not exert any effect on adipocyte size from WAT (Fig. 2J). Surprisely, the expression of the adipogenic transcriptional factor, sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1), was reduced in WAT of both OB (71%, P < 0.01 vs CTL) and OB-OC (70%, P < 0.001 vs CTL) groups when compared to CTL group (Fig. 2K).

#### 3.3. uOC improves IR and inflammation in 3T3-L1 adipocytes

In order to confirm the beneficial effects of uOC on IR and inflammation found in WAT of obese animals, we investigated the effects of this hormone alone or followed by TNF-a challenge in 3T3-L1 adipocytes. Dose-response effect experiments showed that 20 ng/mL of uOC significantly increases the content of *Slc2a4* mRNA (88%, P < 0.05 vs CTL, Fig. 3A). We then tested if pretreatment with uOC would prevent TNFa-induced downregulation of *Slc2a4*/GLUT4 expression. We have previously demonstrated that 1 h-incubation with 40 ng/mL TNF-a increases NFKB specific binding in *Slc2a4* promoter resulting in reduced gene transcription [19]. Here, our data show that 20 ng/mL TNF-a for 24 h promotes significant reduction in the expression of *Slc2a4* gene (60%,

### J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx

### 4

Table 1

Primer sequences for mouse genes used in RT-qPCR.

Gene	NCBI accession number	Primer pair sequences (5'-3') forward	Reference
		reverse	
Actb	NM_007393	ACTGGGACGACATGGAGAAG	
		GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	
Adipoq	NM_009605	TGGATCTGACGACACCAAAA	[17]
		CGAATGGGTACATTGGGAAC	
Bglap1	NM_007541	GAGGACCATCTTTCTGCTCACT	
		TCACTACCTTATTGCCCTCCTG	
Casp1	NM_009807.2	GGACCCTCAAGTTTTGCCCT	
		CAGATCCTCCAGCAGCAACT	
Ccl2	NM_011333.3	AGGCTGGAGAGCTACAAGAGG	
		GCTGAAGACCTTAGGGCAGAT	
Gapdh	NM_008084	GAAGGTCGGTGTGAACGGATT	[17,18]
		AAGACACCAGTAGACTCCACGA	
Ggcx	NM_019802.5	GAGCAGTCTGGACAACCACA	
		GGTACTCTCCAGCAGGCAAC	
Gprc6a	NM_153071.1	ACGTCTTCATCACCACAAACC	
		TTGCATAAAAGGCAGTGATCC	
ll1b	NM_008361	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	[17]
		CTCTGCTTGTGAGGTGCTGA	
116	NM_031168	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	[17]
		TCCAGTTTGGTAGCATCCATC	
Nfkb1	AY521463.1	CTGACCTGAGCCTTCTGGAC	
		GCAGGCTATTGCTCATCACA	
Nlrp3	NM_145827.3	CTGCACCCGGACTGTAAACT	
		ACCTCACAGAGGGTCACCAC	
Ptprv	NM_007955.3	CAGCTCTCCAGAGACCATCC	
		AACTCCTGGGAAAAGCCATT	
Rplp0	NM_007475	CTGAACATCTCCCCCTTCTCC	
		ATCCCATATCCTCATCTGATTCC	
Rela	AF199371.1	GCAAGGGCATTATCGACTCT	
		CATAACGTTGCAGGAAGCTG	
SIc2a4	NM_009204.2	CIGTGCCATCITGATGACCGTG	[18]
		GTTGGAGAAACCAGCGACAGC	
Srebf1 type c		ATCGGCGCGGAAGCTGTCGGGGTAGCGTC	[18,61]
		ACTGTCTTGGTTGTTGATGAGCTGGAGCAT	
Tnf	NM_013693	GAACTGGCAGAAGAGGCACT	[17]
		GGTCTGGGCCATAGAACTGA	
Vkroc1	NM_178600.2	TTTGGTTGCCTGTTCTACACC	
		GCAACATCAGACCCACATTG	

P < 0.001 vs CTL, Fig. 3C), GLUT4 protein (47%, P < 0.05 vs CTL, Fig. 3D) and *Adipoq* gene (67%, P < 0.001 vs CTL, Fig. 3B). Of note, uOC alone increased the expression of *Slc2a4* (71%, P < 0.001 vs CTL, Fig. 3C) and GLUT4 (75%, P < 0.01 vs CTL, Fig. 3D); additionally, uOC was able to prevent the negative effect of TNF-a on the expression of *Slc2a4*/GLUT4

(Fig. 3C and D). Although uOC alone increased *Adipoq* expression (22%, P < 0.05 vs CTL, Fig. 3B), uOC pretreatment could not prevent the downregulation of *Adipoq* by TNF-a in adipocytes (Fig. 3B). Interestingly, uOC treatment for 24 h was able to increase AKT phosphorylation after acute insulin stimulation (42%, P < 0.05 vs stimulated CTL,

### Table 2

Body measurements and biochemical/metabolic profile of lean control (CTL), saline-treated obese (OB) and uncarboxylated osteocalcin-treated obese (OB-OC) mice.

	CTL	OB	OB-OC
Body weight before treatment (g)	$41.3 \pm 0.5$	$52.1 \pm 0.9^{***}$	$51.6 \pm 1.0^{***}$
Body weight after treatment (g)	$43.1\pm0.6$	54.5 $\pm$ 0.8 ***	$53.8 \pm 0.8^{***}$
Lee obesity index (×100)	$33.6 \pm 0.3$	$37.4 \pm 0.2$ ***	$36.9 \pm 0.3^{***}$
Food ingestion before treatment (g/day)	$4.2\pm0.1$	$4.3\pm0.2$	$4.6\pm0.1$
Food ingestion during treatment (g/day)	$4.3 \pm 0.1$	$4.5\pm0.3$	$4.8\pm0.1$
Water ingestion before treatment (mL/day)	$5.1 \pm 0.2$	$4.9\pm0.1$	$5.7\pm0.6$
Water ingestion during treatment (mL/day)	$5.2 \pm 0.1$	$5.2\pm0.3$	$6.2\pm0.6$
Absolute WAT weight (g)	$0.74\pm0.40$	$1.22 \pm 0.05^{***}$	$1.01 \pm 0.05^{***}$ #
Plasma uncarboxylated osteocalcin (ng/mL)	$1.8\pm0.1$	$0.7 \pm 0.1^{***}$	$2.0 \pm 0.1 \# \# \#$
Plasma glucose (mmol/l)	$8.9\pm1.0$	$10.3 \pm 1.0$	$9.6\pm0.7$
Plasma insulin (pmol/l)	$139.6 \pm 41.3$	$801.6 \pm 193.0^{*}$	$634.4 \pm 155.1$
Fructosamine (µmol/l)	$189.6 \pm 21.1$	$256.1 \pm 11,1^{*}$	$228.7 \pm 9.89$
kITT (%/min)	$2.1\pm0.2$	$0.7 \pm 0.1^{***}$	$1.6 \pm 0.1 \#$

Data are means  $\pm$  of SEM from 5 to 13 (morphologic parameters) and 4 to 9 (metabolic-hormonal parameters) animals. Weight of food and volume of water ingestion were measured during 4 weeks before treatment (week 15 to 19) and during osteocalcin treatment (week 19 to 23). kITT, glucose disappearance constant from intravenous insulin tolerance test; WAT, white adipose tissue. Data from blood glucose for kITT and plasma parameters were obtained from mice subjected to 4-hour food deprivation. \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001 vs C, #P < 0.05 and ###P < 0.001 vs OB, ANOVA and Newman–Keuls *post hoc* test.

J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx





#### J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx



**Fig. 2. Osteocalcin reduces inflammation in WAT**. Mice were separated into 3 groups: lean control (CTL, white bars), saline-treated obese (OB, gray bars) and uncarboxylated osteocalcintreated obese (OB-OC, black bars) mice. Relative expression of *Tnf*(A), *ll1b* (B), *ll6* (C), *Ccl2* (D), *Casp1* (E), *Nlrp3* (F) and *Srebf1* (K) mRNA in adipose tissue normalized by *Actb* (RT–qPCR). Histomorphometrical analysis of WAT (G, H, I, and J). Photomicrographs of representative adipose tissue of lean control mice (G); saline-treated obese mice (H), arrows ( $\rightarrow$ ) indicate hypertrophic adipocytes surrounded by crown-like structures, asterisk (\*) indicates area of fibrosis and diffuse infltrate of lymphocytes; and, uncarboxylated osteocalcin-treated obese mice (I), arrow ( $\rightarrow$ ) indicate hypertrophic adipocytes partially surrounded by crown-like structures. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 4 to 7 animals per group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.01 vs CTL, #*P* < 0.05 and ###*P* < 0.01 vs OE; ANOVA and Newman–Keuls *post hoc* test.

J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx





J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 3 (continued).

Fig. 3E), showing that uOC is able to increase insulin sensitivity. We also found that uOC pretreatment prevented TNF-a-induced inflammation in adipocytes by reducing the expression of *Tnf* (41%,

P < 0.01 vs TNF, Fig. 3F), *Ccl2* (31%, P < 0.05 vs TNF, Fig. 3G) and *Nfkb1* (28%, P < 0.05 vs TNF, Fig. 3H). Moreover, increased nuclear content of NFKB subunit p65 was found in TNF-a induced cells

Please cite this article as: J.A.C. Guedes, et al., Osteocalcin improves insulin resistance and inflammation in obese mice: Participation of white adipose tissue and bone, Bone (2017), https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.11.020

8

(4-fold vs CTL, P < 0.001, Fig. 3J); nonetheless, uOC pretreatment reduced the NFKB subunit p65 activation in TNF-a induced cells (30% vs TNF, P < 0.05, Fig. 3J).

### 3.4. Reduced Bglap expression in femur of obese mice

Next, we investigated the expression of *Bglap* and enzymes involved in osteocalcin carboxylation in femur. We found that *Bglap* gene is reduced in femur of OB mice (39%, P < 0.05 vs CTL, Fig. 4A), and that *Bglap* expression in femur negatively correlates with body weight (Pearson r = -0.673, P < 0.01, Fig. 4D) and WAT weight (Pearson r = -0.5364, P < 0.05, Fig. 4E). Similarly, reduced circulating levels of uOC was observed in OB mice (61%, P < 0.05 vs CTL, Table 2). Even though the plasma uOC level was completely recovered after uOC treatment (Table 2), uOC treatment did not recover *Bglap* expression in femur of OB mice (Fig. 4A).

In respect of enzymes involved in osteocalcin carboxylation, Ggcx (Fig. 4B) and vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*Vkroc1*) (Fig. 4C), the expression of *Vkroc1* gene was not affected in femur of OB mice (Fig. 4C); nevertheless, uOC treatment resulted in reduced Ggcx expression (22% vs CTL, 33% vs OB, P < 0.05, Fig. 4B).

#### 3.5. Osteocalcin improves IR in bone of obese mice

Increased gene expression of osteoprotegerin (*Opg*) and protein tyrosine phosphatase (*Ptprv*) in osteoblasts are indicative of bone IR [15,55]. In femur of OB mice, the expression of *Opg* and *Ptprv* increased (53 and 49% vs CTL, P < 0.05 Fig. 5A and B, respectively), and phosphorylation of AKT induced by insulin decreased (40% vs CTL, Fig. 5G). Together with this findings, the reduced circulating levels of uOC (Table 2) points out to an increased bone IR. In contrast, uOC treatment reduced the expression of *Opg* (Fig. 5A) and *Ptprv* (Fig. 5B) to control levels, and recovered AKT phosphorylation (Fig. 5G) showing improvement of bone IR by uOC treatment in OB mice. *Rankl* expression did not change among all groups (Fig. 5C).

Besides the role of osteocalcin in glucose metabolism, it has been recently demonstrated *in vitro* and *in vivo* that GLUT4 contributes to whole-body glucose clearance in osteoblasts [31]. To verify the participation of bone in glucose clearance, we investigated the expression of *Slc2a4*/GLUT4 in femur. A qualitative comparison showed that the expression of GLUT4 protein in femur is much lower than in WAT (Fig. 5D). Moreover, neither obesity nor uOC treatment affected the *Slc2a4*/GLUT4 content in femur (Fig. 5E and F).

### 3.6. TNF-a induces inflammation in MC3T3-E1 osteoblasts but obesity does not induce local inflammation in bone

To address the hypothesis that bone could be a site of inflammation in obesity, we first treated MC3T3-E1 osteoblasts with different concentrations of TNF-a for 4 h and analyzed the expression of several genes involved in inflammation. Successful in vitro mineralization could be visualized with Alizarin Red S staining which specifically stains the extracellular calcium deposits in bright orange-red color (Fig. 6A). We observed a dose-response effect of TNF-a on the upregulation of inflammatory genes, including Tnf (4.4 to 7.3-fold vs CTL, P < 0.05, Fig. 6B), *Il6* (2.8 to 3.4-fold *vs* CTL, *P* < 0.05, Fig. 6C), and *Ccl2* (2 to 2.2fold vs CTL, P < 0.05, Fig. 6D). Additionally, all concentrations of TNF-a downregulated the expression of Bglap (34 to 45%, P < 0.05, Fig. 6E). Interestingly, even though TNF-a-induced inflammation in MC3T3-E1, we observed that inflammation-related genes, such as Tnf (Fig. 6F), Il1b (Fig. 6G), Il6 (Fig. 6H), and Ccl2 (Fig. 6I) in femur were not affected by obesity, which is a state of low-grade inflammation but did not induce local inflammation in this tissue.

### 4. Discussion

One decade has passed since the discovery of osteocalcin as a bonederived hormone which exerts an important role in energy metabolism [30]. Here we investigated the mechanisms involved in uOC improved whole-body IR.

IR is not only a consequence of reduced insulin signaling but it is also a consequence of reduced expression of the glucose transporter GLUT4 [17,20,41], which mediates insulin stimulated-glucose uptake in adipose tissue and skeletal muscle. In this respect, GLUT4null mice are insulin resistant and hyperglycemic [51,60], overexpression of GLUT4 increases glucose tolerance and insulin sensitivity [47], and the recovery of GLUT4 expression clearly improves wholebody IR [17,44]. Moreover, NFKB pathway links IR and inflammation by not only interfering in insulin signaling [25,48], but also negatively modulating the expression of Slc2a4/GLUT4 [7,18,19,44]. Here we demonstrated that uOC improves whole-body insulin resistance by having positive effects on WAT glucose metabolism, such as recovering insulin signaling and Slc2a4/GLUT4 expression, and greatly reducing inflammation, especially by interfering in the NFKB p65 activation. Additionally, according to our results, another mechanism of uOC in improving IR is reducing the expression of inflammasome machinery, which is reported to provoke obesityinduced inflammation and IR [54].

The levels of plasma adiponectin, an adipocyte derived-hormone, is decreased in obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [3,56]. Our data showed that uOC increased the expression of *Adipoq* in 3T3-L1 cells, as previously demonstrated [30]; however, in these cells, uOC could not prevent the downregulation of *Adipoq* induced by TNF-a. This mechanism could explain the absence of effect on the expression of *Adipoq* by uOC in WAT of MSG OB mice, since these animals have increased expression of TNF-a in WAT, as reported here and elsewhere [17], and increased circulating levels of TNF-a [17].

Although uOC improved IR and inflammation in adipose tissue, and also reduced the size of this tissue, it did not change the size of the enlarged adipocytes of obese mice. The enlargement of adipose tissue can occur by hyperplasia (adipocyte number increase) and hypertrophy (adipocyte size increase). During the progression of obesity, it has been suggested that first adipose becomes hypertrophic and then triggers hyperplasia [13]. Considering that MSG OB mice were already obese before the treatment, and that MSG OB mice that is 4 weeks older than the MSG OB mice from the present work [59], even though these animals have the same body weight, that 4-week older MSG OB animals have an increase of 69% in fat pad mass when compared to the MSG OB mice, obesity is in a constant progress and, possibly, the 4-week uOC treatment had reduced the hyperplasia phase, resulting in a lower fat pad mass.

Moreover, molecular analysis revealed that the expression of *Srebf1*, a transcriptional factor that even though is involved in adipogenesis, was found to be downregulated in both OB and OB-OC animals. Although it may seem contradictory, some studies have shown that *Srebf1* expression is decreased in adipose tissue of obese subjects [12,46]. Downregulation of *Srebf1* expression in obese state could be a consequence of homeostatic mechanism of hypertrophic adipocytes to prevent further enlargement.

As discussed above, the reduced expression of *Slc2a4*/GLUT4 in both WAT and skeletal muscle is a hallmark of IR. Here we studied the mechanisms of uOC improved-IR only in WAT since we did not found any change in *Slc2a4*/GLUT4 expression in skeletal muscle of 23-week old MSG OB mice. On the other hand, older MSG OB mice are also diabetic and have reduced GLUT4 content in skeletal muscle [8,41,59]. This could partially explain why the development of insulin resistance in obesity [42] and T2DM [23] is temporal and tissue-specific. Additionally, since liver is also an important site for



**Fig. 4. Effect of obesity and osteocalcin treatment in the expression of** *Bglap* **and enzymes involved in osteocalcin carboxylation in femur**. Mice were separated into 3 groups lean control (CTL, white bars), saline-treated obese (OB, gray bars) and uncarboxylated osteocalcin-treated obese (OB-OC, black bars) mice. Relative expression of *Bglap* (A), *Ggcx* (B), and *Vkroc* (C) mRNA in femur, normalized by *Actb* (RT-qPCR). Data are expressed as means ± SEM of 5 to 8 animals per group. \**P* < 0.05 vs CTL, #*P* < 0.05 and vs OB; ANOVA and Newman–Keuls *post hoc* test. Correlation of *Bglap* expression in femur and body weight (D), and WAT weight (E), Pearson correlation test.

IR, other studies should be addressed to unravel the molecular mechanisms of uOC in this tissue.

It is known that under certain conditions, osteoblasts can produce proinflammatory cytokines [6,9], and that the imbalance between adipogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells can result in increased adiposity in bone marrow of obese mice [11]. Here we observed that TNF-a represses *Bglap* expression in osteoblasts. In light of these evidences, it would be reasonable to think that bone could be a site of inflammation in obesity, resulting in reduced osteocalcin secretion. However, although our *in vitro* findings showed that TNF-a

Please cite this article as: J.A.C. Guedes, et al., Osteocalcin improves insulin resistance and inflammation in obese mice: Participation of white adipose tissue and bone, Bone (2017), https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.11.020

10



**Fig. 5. Osteocalcin improves IR in bone of obese mice**. Mice were separated into 3 groups: lean control (CTL, white bars), saline-treated obese (OB, gray bars) and uncarboxylated osteocalcin-treated obese (OB-OC, black bars) mice. Relative expression of *Opg* (A), *Ptprv* (B), *Rankl* (C), and *Slc2a4* (E) mRNA in femur normalized by *Actb* (RT-qPCR). Comparison of GLUT4 protein content between WAT and femur of control mice (D). Relative content of GLUT4 (F) and pAKT/AKT (G) protein in femur normalized by total protein analysis with Ponceau-stained gel (Western blotting). In (D) and (F), 30 µg of protein was immunoblotted for GLUT4 protein; and, in (G) 50 µg, for pAKT/AKT. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 4 to 8 animals per group. \**P* < 0.05 vs CTL, #*P* < 0.05 and #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 vs OB; ANOVA and Newman–Keuls *post hoc* test. AU, arbitrary units.

### 12

### ARTICLE IN PRESS

J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx





#### J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx

upregulates the expression of several cytokines and chemokines in MC3T3-E1 osteoblasts, we demonstrated for the first time that the expression of genes involved in inflammation is not increased in bone of obese mice, strongly suggesting that obesity does not induce local inflammation in bone.

In opposite to the OC knockout mouse model that showed increased insulin resistance [30], the OC knockout rat model showed increased insulin sensitivity [29]. Besides, the role of osteocalcin in glucose metabolism in humans is still unconclusive. While a retrospective cohort study showed no association between baseline osteocalcin levels and the development of T2DM [22], several clinical studies supports osteocalcin exerts beneficial effects on glucose metabolism [1,24,26-28,32,43,57,58]. Additionally, a meta-analysis, which included 39 studies involving 23,381 participants pointed out that both uOC and total OC are negatively correlated with fasting plasma glucose and glycated hemoglobin A1c [32]. However, only few of the above-mentioned studies specifically analyzed uOC levels in circulation [24,32,58]. Notably, our findings showed that OB mice have reduced levels of plasma uOC, and that Bglap expression in femur is negatively correlated with body weight and WAT weight. Reduced circulating uOC in OB mice could be a consequence of reduced Bglap expression observed in femur and increased IR in bones. In this respect, the higher expression of Opg and Ptprv genes observed in femur of obese mice together with reduced insulin signaling highlights the presence of bone IR in our animal model.

*Opg* encodes osteoprotegerin (OPG), a secreted factor that prevents the binding of RANKL, a cell membrane protein, to RANK, an osteoclast membrane receptor, resulting in inhibition of bone resorption. It is known that insulin inhibits *Opg* expression in osteoblasts favouring osteoclast differentiation [15], and consequently bone resorption which is facilitated by local acidification. Because low pH is necessary for protein decarboxylation outside the cell, the literature points out that osteocalcin decarboxylation is a result of osteoclast activity stimulated by insulin signaling in osteoblasts [15,55].

*Ptprv*, also known as *Esp*, encodes the osteotesticular protein tyrosine phosphatase (OST-PTP) in murine osteoblasts [36]. Knockout mice  $Esp^{-/-}$  are protected from obesity and glucose intolerance; in addition, evidences show that OST-PTP negatively regulates the insulin receptor [15], and exerts a key regulation in post-translational  $\gamma$ carboxylation of osteocalcin [30].

Besides decreased insulin-induced AKT phosphorylation, we found that both *Opg* and *Ptprv* are upregulated in bone of OB mice, indicating bone IR in obesity, which would contribute to the reduced circulating levels of uOC and whole-body IR found in OB mice. Notably, our investigation also showed that uOC treatment not only downregulated *Ptprv* and *Opg* expression to normal levels but also increased insulin-induced AKT phosphorylation, highlighting that uOC contributes to improve bone IR in OB mice. Additionally, uOC reduced the expression of the enzyme involved in osteocalcin carboxylation, *Ggcx*, in femur; therefore, this mechanism together with improved IR in bones by uOC shows that adequate levels of circulating uOC is important to maintain a proper release of uOC from skeleton into the circulation, which in turn is essential for the maintenance of glucose homeostasis.

Recently, it has been shown that the loss of GLUT4 specifically in osteoblasts impacts whole-body glucose disposal [31], suggesting that besides the secretion of uOC, the skeleton could directly contribute to the insulin induced-glucose clearance by GLUT4 modulation. Here we investigated for the first time the impact of obesity in *Slc2a4/GLUT4* expression in bones and we did not find any change. This finding suggests that, in our animal model, the contribution of bones to whole-body IR is due not to the modulation of GLUT4 expression but to reduced secretion of uOC, which exerts positive effects on glucose metabolism.

Taken together, here we demonstrated that uOC improves wholebody IR in obese mice by improving IR in: (1) WAT, by decreasing inflammation, increasing insulin signaling and upregulating *Slc2a4/ GLUT4* expression, and (2) bone, by increasing insulin signaling, downregulating *Opg* and *Ptprv* expression, and consequently, increasing the circulating levels of uOC.

### Funding

This research was supported by grant from FAPESP (São Paulo State Foundation for Research, 2013/18841-1, 2014/10007-5 and 2015/01576-9) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel).

### Acknowledgements

The authors are greatly indebt to Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado (Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo) for his kind supply of several reagents and helpful discussions.

### **Disclosure statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Authors' contributions

JACG and DTF designed the study. JACG, DTF, JVE and MRPTM conducted the experiments and analyzed the data with TMTZ. DTF wrote the manuscript and JACG and JVE reviewed it.

#### References

- A.A. Alfadda, A. Masood, S.A. Shaik, H. Dekhil, M. Goran, Association between osteocalcin, metabolic syndrome, and cardiovascular risk factors: role of total and undercarboxylated osteocalcin in patients with type 2 diabetes, Int. J. Endocrinol. 2013 (2013), 197519. https://doi.org/10.1155/2013/197519.
- [2] A.E. Andreazzi, D.X. Scomparin, F.P. Mesquita, S.L. Balbo, C. Gravena, J.C. De Oliveira, W. Rinaldi, R.M. Garcia, S. Grassiolli, P.C. Mathias, Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice, J. Endocrinol. 201 (3) (Jun 2009) 351–359.
- [3] Y. Arita, S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, Biochem. Biophys. Res. Commun. 425 (3) (1999) 560–564 Aug 31 2012 https://doi.org/10. 1016/j.bbrc.2012.08.024.
- [4] K.L. Berkner, The vitamin K-dependent carboxylase, Annu. Rev. Nutr. 25 (2005) 127–149 (Review).
- [5] E. Bonora, P. Moghetti, C. Zancanaro, M. Cigolini, M. Querena, V. Cacciatori, A. Corgnati, M. Muggeo, Estimates of *in vivo* insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies, J. Clin. Endocrinol. Metab. 68 (2) (Feb 1989) 374–378.
- [6] K.M. Bussard, D.J. Venzon, A.M. Mastro, Osteoblasts are a major source of inflammatory cytokines in the tumor microenvironment of bone metastatic breast cancer, J. Cell. Biochem. 111 (5) (2010) 1138–1148, https://doi.org/10.1002/jcb.22799.
- [7] R.S. Campello, A.B. Alves-Wagner, T.F. Lucas, R.C. Mori, D.T. Furuya, C.S. Porto, U.F. Machado, Estrogen receptor 1 agonist PPT stimulates SIc2a4 gene expression and improves insulin-induced glucose uptake in adipocytes, Curr. Top. Med. Chem. 12 (19) (2012) 2059–2069.
- [8] P. de Carvalho Papa, A.M. Vargas, J.L. da Silva, M.T. Nunes, U.F. Machado, GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice, Life Sci. 71 (16) (Sep 6 2002) 1917–1928.
- [9] U. Dapunt, T. Giese, S. Stegmaier, A. Moghaddam, G.M. Hänsch, The osteoblast as an inflammatory cell: production of cytokines in response to bacteria and components of bacterial biofilms, BMC Musculoskelet. Disord. 17 (2016), 243. https://doi.org/10. 1186/s12891-016-1091-y.
- [10] R. Dawson Jr., Z. Annau, A behavioral assessment of arcuate nucleus damage after a single injection of monosodium glutamate, Neurobehav. Toxicol. Teratol. 5 (4) (Jul-Aug 1983) 399–406.
- [11] C.R. Doucette, M.C. Horowitz, R. Berry, O.A. MacDougald, R. Anunciado-Koza, R.A. Koza, C.J. Rosen, A high fat diet increases bone marrow adipose tissue (MAT) but does not alter trabecular or cortical bone mass in C57BL/6J mice, J. Cell. Physiol. 230 (9) (Sep 2015) 2032–2037, https://doi.org/10.1002/ jcp.24954.

#### J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx

- [12] P.H. Ducluzeau, N. Perretti, M. Laville, F. Andreelli, N. Vega, J.P. Riou, H. Vidal, Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes, Diabetes 50 (5) (May 2001) 1134–1142.
- [13] I.M. Faust, P.R. Johnson, J.S. Stern, J. Hirsch, Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity, Am. J. Phys. 235 (3) (Sep 1978) E279–86.
- [14] M. Ferron, E. Hinoi, G. Karsenty, P. Ducy, Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (13) (Apr 1 2008) 5266–5270, https://doi.org/10.1073/pnas.0711119105.
- [15] M. Ferron, J. Wei, T. Yoshizawa, A. Del Fattore, R.A. DePinho, A. Teti, P. Ducy, G. Karsenty, Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism, Cell 142 (2) (Jul 23 2010) 296–308, https://doi.org/10.1016/j.cell. 2010.06.003.
- [16] M. Ferron, M.D. McKee, R.L. Levine, P. Ducy, G. Karsenty, Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice, Bone 50 (2) (2012) 568–575.
- [17] D.T. Furuya, A.C. Poletto, R.R. Favaro, J.O. Martins, T.M. Zorn, U.F. Machado, Antiinflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice, Metabolism 59 (3) (Mar 2010) 395–399, https:// doi.org/10.1016/j.metabol.2009.08.011.
- [18] D.T. Furuya, A.C. Poletto, H.S. Freitas, U.F. Machado, Inhibition of cannabinoid CB1 receptor upregulates Slc2a4 expression via nuclear factor-kB and sterol regulatory element-binding protein-1 in adipocytes, J. Mol. Endocrinol. 49 (2) (Jul 25 2012) 97–106, https://doi.org/10.1530/JME-12-0037.
- [19] D.T. Furuya, E.A. Neri, A.C. Poletto, G.F. Anhê, H.S. Freitas, R.S. Campello, N.A. Rebouças, U.F. Machado, Identification of nuclear factor-κB sites in the Slc2a4 gene promoter, Mol. Cell. Endocrinol. 370 (1–2) (May 6 2013) 87–95, https://doi. org/10.1016/j.mce.2013.01.019.
- [20] T.E. Graham, Q. Yang, M. Blüher, A. Hammarstedt, T.P. Ciaraldi, R.R. Henry, C.J. Wason, A. Oberbach, P.A. Jansson, U. Smith, B.B. Kahn, Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects, N. Engl. J. Med. 354 (24) (Jun 15 2006) 2552–2563.
- [21] J. Himms-Hagen, Brown adipose tissue thermogenesis and obesity, Prog. Lipid Res. 28 (2) (1989) 67–115 (Review).
- [22] Y.-C. Hwang, J.-H. Jee, I.-K. Jeong, K.J. Ahn, H.Y. Chung, M.-K. Lee, Circulating osteocalcin level is not associated with incident type 2 diabetes in middle-aged male subjects: mean 8.4-year retrospective follow-up study, Diabetes Care 35 (9) (2012) 1919–1924, https://doi.org/10.2337/dc11-2471.
- [23] T. Jelenik, G. Séquaris, K. Kaul, D.M. Ouwens, E. Phielix, J. Kotzka, B. Knebel, J. Weiß, A.L. Reinbeck, L. Janke, P. Nowotny, H.J. Partke, D. Zhang, G.I. Shulman, J. Szendroedi, M. Roden, Tissue-specific differences in the development of insulin resistance in a mouse model for type 1 diabetes, Diabetes 63 (11) (Nov 2014) 3856–3867, https://doi.org/10.2337/db13-1794.
- [24] I. Kanazawa, T. Yamaguchi, M. Yamauchi, M. Yamamoto, S. Kurioka, S. Yano, T. Sugimoto, Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus, Osteoporos. Int. 22 (1) (Jan 2011) 187–194, https://doi.org/10.1007/s00198-010-1184-7.
- [25] J.K. Kim, Y.J. Kim, J.J. Fillmore, Y. Chen, I. Moore, J. Lee, M. Yuan, Z.W. Li, M. Karin, P. Perret, S.E. Shoelson, G.I. Shulman, Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate, J. Clin. Invest. 108 (3) (Aug 2001) 437–446.
- [26] S.H. Kim, J.W. Lee, J.A. Im, H.J. Hwang, Serum osteocalcin is related to abdominal obesity in Korean obese and overweight men, Clin. Chim. Acta 411 (23–24) (Dec 14 2010) 2054–2057, https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.046.
- [27] J.M. Kindblom, C. Ohlsson, O. Ljunggren, M.K. Karlsson, A. Tivesten, U. Smith, D. Mellström, Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men, J. Bone Miner. Res. 24 (5) (May 2009) 785–791, https://doi.org/10.1359/jbmr.081234.
- [28] M. Korostishevsky, I. Malkin, S. Trofimov, Y. Pei, H.-W. Deng, G. Livshits, Significant association between body composition phenotypes and the osteocalcin genomic region in normative human population, Bone 51 (4) (2012) 688–694, https://doi.org/ 10.1016/j.bone.2012.07.010.
- [29] LJ. Lambert, A.K. Challa, A. Niu, L. Zhou, J. Tucholski, M.S. Johnson, T.R. Nagy, A.W. Eberhardt, P.N. Estep, R.A. Kesterson, J.M. Grams, Increased trabecular bone and improved biomechanics in an osteocalcin-null rat model created by CRISPR/Cas9 technology, Dis. Model. Mech. 9 (10) (Oct 1 2016) 1169–1179.
- [30] N.K. Lee, H. Sowa, E. Hinoi, M. Ferron, J.D. Ahn, C. Confavreux, R. Dacquin, P.J. Mee, M.D. McKee, D.Y. Jung, Z. Zhang, J.K. Kim, F. Mauvais-Jarvis, P. Ducy, G. Karsenty, Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton, Cell 130 (3) (Aug 10 2007) 456–469.
- [31] Z. Li, J.L. Frey, G.W. Wong, M.C. Faugere, M.J. Wolfgang, J.K. Kim, R.C. Riddle, T.L. Clemens, Glucose transporter-4 facilitates insulin-stimulated glucose uptake in osteoblasts, Endocrinology 157 (11) (Nov 2016) 4094–4103.
- [32] D.M. Liu, X.Z. Guo, H.J. Tong, B. Tao, L.H. Sun, H.Y. Zhao, G. Ning, J.M. Liu, Association between osteocalcin and glucose metabolism: a meta-analysis, Osteoporos. Int. 26 (12) (Dec 2015) 2823–2833, https://doi.org/10.1007/s00198-015-3197-8 (Epub 2015 Jun 19. Erratum in: Osteoporos Int. 2015 Dec;26(12):2835-6).
- [33] N.S. Lobato, F.P. Filgueira, E.H. Akamine, A.P. Davel, L.V. Rossoni, R.C. Tostes, M.H. Carvalho, Z.B. Fortes, Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids, Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 21 (10) (Oct 2011) 808–816.
- [34] J.F. Lorden, A. Caudle, Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse, Neurobehav. Toxicol. Teratol. 8 (5) (Sep–Oct 1986) 509–519.
- [35] D. Maiter, L.E. Underwood, J.B. Martin, J.I. Koenig, Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing

hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats, Endocrinology 128 (2) (Feb 1991) 1100–1106.

- [36] L.J. Mauro, E.A. Olmsted, B.M. Skrobacz, R.J. Mourey, A.R. Davis, J.E. Dixon, Identification of a hormonally regulated protein tyrosine phosphatase associated with bone and testicular differentiation, J. Biol. Chem. 269 (48) (Dec 2 1994) 30659–30667.
- [37] M.J. Morris, C.F. Tortelli, A. Filippis, J. Proietto, Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamatetreated rat, Regul. Pept. 75–76 (Sep 25 1998) 441–447.
- [38] T. Nakai, T. Tamai, H. Takai, S. Hayashi, R. Fujiwara, S. Miyabo, Decreased ketonaemia in the monosodium glutamate-induced obese rats, Life Sci. 38 (22) (Jun 2 1986) 2009–2013.
- [39] H. Nakajima, Y. Tochino, H. Fujino-Kurihara, K. Yamada, M. Gomi, K. Tajima, T. Kanaya, A. Miyazaki, J. Miyagawa, T. Hanafusa, et al., Decreased incidence of diabetes mellitus by monosodium glutamate in the non-obese diabetic (NOD) mouse, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 50 (2) (Nov 1985) 251–257.
- [40] C.B. Nemeroff, R.J. Konkol, G. Bissette, W. Youngblood, J.B. Martin, P. Brazeau, M.S. Rone, A.J. Prange Jr., G.R. Breese, J.S. Kizer, Analysis of the disruption in hypothalamic-pituitary regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG): evidence for the involvement of tuberoinfundibular cholinergic and dopaminergic systems in neuroendocrine regulation, Endocrinology 101 (2) (Aug 1977) 613–622.
- [41] P.C. Papa, P.M. Seraphim, U.F. Machado, Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice, Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 21 (11) (Nov 1997) 1065–1070.
- [42] S.Y. Park, Y.R. Cho, H.J. Kim, T. Higashimori, C. Danton, M.K. Lee, A. Dey, B. Rothermel, Y.B. Kim, A. Kalinowski, K.S. Russell, J.K. Kim, Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice, Diabetes 54 (12) (Dec 2005) 3530–3540.
- [43] A.G. Pittas, S.S. Harris, M. Eliades, P. Stark, B. Dawson-Hughes, Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype, J. Clin. Endocrinol. Metab. 94 (3) (Mar 2009) 827–832, https://doi.org/10.1210/jc.2008-1422.
- [44] A.C. Poletto, A. David-Silva, A.P. Yamamoto, U.F. Machado, D.T. Furuya, Reduced Slc2a4/GLUT4 expression in subcutaneous adipose tissue of monosodium glutamate obese mice is recovered after atorvastatin treatment, Diabetol. Metab. Syndr. 7 (Mar 14 2015), 18. https://doi.org/10.1186/s13098-015-0015-6.
- [45] M.I. Schmidt, B.B. Duncan, Diabesity: an inflammatory metabolic condition, Clin. Chem. Lab. Med. 41 (9) (Sep 2003) 1120–1130 (Review).
- [46] C. Sewter, D. Berger, R.V. Considine, G. Medina, J. Rochford, T. Ciaraldi, R. Henry, L. Dohm, J.S. Flier, S. O'Rahilly, A.J. Vidal-Puig, Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha, Diabetes 51 (4) (Apr 2002) 1035–1041.
- [47] P.R. Shepherd, L. Gnudi, E. Tozzo, H. Yang, F. Leach, B.B. Kahn, Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue, J. Biol. Chem. 268 (30) (Oct 25 1993) 22243–22246.
- [48] S.E. Shoelson, J. Lee, A.B. Goldfine, Inflammation and insulin resistance, J. Clin. Invest. 116 (7) (Jul 2006) 1793–1801 (Review. Erratum in: J Clin Invest. 2006 Aug;116(8): 2308).
- [51] A.E. Stenbit, T.S. Tsao, J. Li, R. Burcelin, D.L. Geenen, S.M. Factor, K. Houseknecht, E.B. Katz, M.J. Charron, GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes, Nat. Med. 3 (10) (Oct 1997) 1096–1101.
- [52] A.S. Stephens, S.R. Stephens, N.A. Morrison, Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. BMCRes, Notes 4 (Oct 14 2011) 410, https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-410.
- [53] J.S. Thacker, D.H. Yeung, W.R. Staines, J.G. Mielke, Total protein or highabundanceprotein: which offers the best loading control for western blotting? Anal. Biochem. 496 (Mar 1 2016) 76–78, https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.11.022.
- [54] B. Vandanmagsar, Y.H. Youm, A. Ravussin, J.E. Galgani, K. Stadler, R.L. Mynatt, E. Ravussin, J.M. Stephens, V.D. Dixit, The NLRP3 inflammasome instigates obesityinduced inflammation and insulin resistance, Nat. Med. 17 (2) (Feb 2011) 179–188, https://doi.org/10.1038/nm.2279.
- [55] J. Wei, M. Ferron, C.J. Clarke, Y.A. Hannun, H. Jiang, W.S. Blaner, G. Karsenty, Bonespecific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation, J. Clin. Invest. 124 (4) (Apr 2014) 1–13, https://doi.org/10. 1172/JCI72323.
- [56] C. Weyer, T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R.E. Pratley, P.A. Tataranni, Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia, J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 (5) (May 2001) 1930–1935.
- [57] B.B. Yeap, S.A. Chubb, L. Flicker, K.A. McCaul, P.R. Ebeling, J.P. Beilby, P.E. Norman, Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men *via* waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels, Eur. J. Endocrinol. 163 (2) (Aug 2010) 265–272, https://doi.org/10.1530/EJE-10-0414.
- [58] B.B. Yeap, H. Alfonso, S.A. Chubb, R. Gauci, E. Byrnes, J.P. Beilby, P.R. Ebeling, D.J. Handelsman, C.A. Allan, M. Grossmann, P.E. Norman, L. Flicker, Higher serum undercarboxylated osteocalcin and other bone turnover markers are associated with reduced diabetes risk and lower estradiol concentrations in older men, J. Clin. Endocrinol. Metab. 100 (1) (Jan 2015) 63–71, https://doi.org/10.1210/jc. 2014-3019.
- [59] C.Y. Yonamine, E. Pinheiro-Machado, M.L. Michalani, A.B. Alves-Wagner, J.V. Esteves, H.S. Freitas, U.F. Machado, Resveratrol improves glycemic control in type 2 diabetic obese mice by regulating glucose transporter expression in skeletal muscle and liver, Molecules 22 (7) (Jul 14 2017) pii: E1180 https://doi.org/10.3390/ molecules22071180.

Please cite this article as: J.A.C. Guedes, et al., Osteocalcin improves insulin resistance and inflammation in obese mice: Participation of white adipose tissue and bone, Bone (2017), https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.11.020

14

### J.A.C. Guedes et al. / Bone xxx (2017) xxx-xxx

- [60] A. Zisman, O.D. Peroni, E.D. Abel, M.D. Michael, F. Mauvais-Jarvis, B.B. Lowell, J.F. Wojtaszewski, M.F. Hirshman, A. Virkamaki, L.J. Goodyear, C.R. Kahn, B.B. Kahn, Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance, Nat. Med. 6 (8) (Aug 2000) 924–928.
- [61] I. Shimomura, H. Shimano, J.D. Horton, J.L. Goldstein, M.S. Brown, Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells, J. Clin. Invest. 99 (5) (1997 Mar 1) 838–845.