

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINARIA

Matheus Colpo Spricigo

IMPACTO DA OSTEOCALCINA NA ESTEROIDOGENESE OVARIANA

Santa Maria, RS

2021

Matheus Colpo Spricigo

**IMPACTO DA OSTEOCALCINA NA ESTEROIDOGENESE
OVARIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Vasconcellos Comim

Santa Maria, RS

2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Spricigo, Matheus Colpo
Impacto da osteocalcina na esteroidogênese ovariana /
Matheus Colpo Spricigo.- 2021.
40 p.; 30 cm

Orientador: Fabio Vasconcellos Comim
Coorientador: Alfredo Quites Antoniazzi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Teca 2. Osteocalcina 3. Ovários Bovinos 4.
Esteroidogênese 5. CYP17 I. Comim, Fabio Vasconcellos
II. Antoniazzi, Alfredo Quites III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MATHEUS COLPO SPRICIGO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Matheus Colpo Spricigo

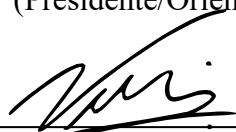
IMPACTO DA OSTEOCALCINA NA ESTEROIDOGENESE OVARIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 25 de Agosto de 2021



Fabio Vasconcellos Comim, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Valerio Valdetar Marques Portela Junior, PhD. (UFSM)
(Videoconferência)



Melissa Orlandin Premaor, Dr. (UFMG) (Videoconferência)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

À minha família

A Universidade Federal de Santa Maria

Ao Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária

Aos Orgãos financiadores CAPES, CNPq, FAPERGS, FAPESP e Finep, por proporcionarem condições de trabalho e realização dos experimentos.

Aos meus professores, especialmente meu orientador Fábio Vasconcellos Comin pelos ensinamentos e pela orientação e aos professores Alfredo Quites Antoniazzi e Valério Marques Portela pelo conhecimento compartilhado.

À colega de orientação Lady, pelos ensinamentos, ajuda e comprometimento nesse trabalho realizado. Muito obrigado!

Aos colegas de Pós-Graduação, Carolina, Daniele, Elisabeth, Igor, Júlia, Leonardo, Manuela, Mariani, Ricardo e Zigomar. Agradeço pelo conhecimento compartilhado e o convívio que tivemos, ajudas nos experimentos e os vários momentos juntos nesses dois anos e meio.

A Todos Estagiarios e IC's pela ajuda, responsabilidade e dedicação.

A secretária do PPGMV Maria pela paciência e comprometimento com nosso atendimento.

*“O mais competente não discute,
domina a sua ciência e cala-se.”
Voltaire*

RESUMO

IMPACTO DA OSTEOCALCINA NA ESTEROIDOGENESE OVARIANA

AUTOR: Matheus Colpo Spricigo
ORIENTADOR: Fábio Vasconcellos Comin

A osteocalcina é conhecida como uma proteína óssea contendo ácido gama-carboxi glutâmico (BGLAP), é um pequeno (49 aminoácidos) hormônio proteico não-colágeno secretado por osteoblastos, geralmente relatado como um marcador de formação óssea. Mais recentemente, outros papéis da osteocalcina na secreção e sensibilidade à insulina foram sugeridos, embora seu impacto na secreção de esteróides ovarianos permaneça obscuro. Portanto, o presente estudo tem como objetivo investigar a presença do receptor de osteocalcina (GPCR6A) nas células da granulosa e da teca do ovário bovino e o possível efeito da osteocalcina sobre enzimas esteroidogênicas. Nossos resultados indicam, pela primeira vez, a presença do receptor osteocalcina GPCR6A nas células e testes da teca e sua ausência ou muito baixa expressão nas células da granulosa. Após o tratamento com osteocalcina não carboxilada (100ng / ml), um tamanho de efeito significativo nas principais enzimas esteroidogênicas (CYP17A1, CYP11A1) e proteína (STAR) foi observado na primeira hora (mas não 24 horas) apenas na presença de co-tratamento com hormônio luteinizante (LH). Doses mais baixas de osteocalcina não carboxilada (1 ng / ml) não foram eficazes para influenciar essas enzimas. Embora limitados, nossos resultados demonstram que parece haver alguma ação da osteocalcina na primeira hora após o tratamento, aumento a expressão de mRNA em enzimas esteroidogênicas chaves como a STAR, CYP11A1 e CYP17A1 de forma sinérgica com o uso de LH (100 ng/ml).

Palavras-chave: Teca. Osteocalcina. Ovários bovinos. Esteroidogênese. CYP17.

ABSTRACT

THE IMPACT OF OSTEOCALCIN ON OVARIAN STEROIDOGENESIS

AUTHOR: Matheus Colpo Spricigo
ADVISOR: Fábio Vasconcellos Comin

Osteocalcin, known as bone gamma-carboxy glutamic acid-containing protein (BGLAP), is a small (49-amino-acid) noncollagenous protein hormone secreted by osteoblasts usually reported as a marker of bone formation. More recently, other roles for osteocalcin in insulin secretion and sensibility have been suggested, although its impact on the ovarian steroid secretion remains obscure. Therefore, the present study aims to investigate the presence of osteocalcin receptor (GPCR6A) in the granulosa and theca cells of the bovine ovary and the possible effect of osteocalcin on steroidogenic enzymes. Our results indicate, for the first time, the presence of the osteocalcin receptor GPRC6A in theca cells and testis and its absence or very low expression in the granulosa cells. After treatment with non-carboxylated osteocalcin (100ng/ml), a significant effect size on the key steroidogenic enzymes (CYP17A1, CYP11A1) and protein (STAR) was observed in the first hour (but not 24-hour) only in the presence of co-treatment with luteinizing hormone (LH). Lower doses of non-carboxylated osteocalcin (1ng/ml) were not effective to influence these enzymes. Although limited, our results demonstrate that there appears to be some action of osteocalcin in the first hour after treatment, increasing mRNA expression in key steroidogenic enzymes such as STAR, CYP11A1, and CYP17A1 synergistically with the use of LH (100 ng/ml).

Keywords: theca, osteocalcin, bovine ovaries, steroidogenesis, CYP17

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1 – Modificação pós-tradução da osteocalcina.

Figura 2 – Ação da osteocalcina no testículo.

ARTIGO

Figura 1. Expression of GPCRA6 in the bovine ovary: theca and granulosa

Figura 2 - Expression of GPRC6A and GPCR158 in theca cells after non-carboxylated osteocalcin treatment

Figura 3 - Expression of CYP17A1, CYP11A1 and STAR in the first hour and after twenty-four after non-carboxylated osteocalcin

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1. Primers used in the study

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. HIPÓTESE.....	13
3. OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADOS	13
3.1 OBJETIVOS GERAIS:	13
3.2 ESPECÍFICOS:	13
4. REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1 OSTEOCALCINA.....	14
4.1.1 Funções endócrinas da osteocalcina não carboxilada	15
4.1.2 Função da osteocalcina no testículo	16
4.2 CÉLULAS DA TECA E A ESTEROIDOGÊNESE.....	17
4.3 RECEPTOR ACOPLADO A PROTEINA G FAMILIA C GRUPO 6 MEMBRO A (GPRC6A)	18
5. ARTIGO	20
Abstract	21
Introduction	21
Material and Methods.....	23
Results	27
Discussion.....	31
Conclusions	32
References.....	33
Legends	35
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

A esteroideogênese ovariana tem seu início nas células da teca onde ocorre a produção de andrógenos que tem seu final nas células da granulosa que devida a ação de varias enzimas acarreta na formação dos estrógenos. O hormônio mais produzido nas células da teca é a androstenediona porém temos como o hormônio de maior relevância reprodutiva a testosterona (BURGER, 2002) essa que pode ser convertida tanto em testosterona na própria teca através de isoenzimas 17β -hidroxiesteroide desidrogenase, ou em estrona nas células da granulosa pela aromatase (CYP19A1) (SIMPSON *et al.*, 1994).

Dentre os vários mecanismos que ocorrem no sistema reprodutivo, o sistema gônadas ossos vem crescendo muito em parâmetro de importância pelas várias ações endócrinas provenientes da osteocalcina. O sistema esquelético que é responsável por aproximadamente 15% do peso corpora total (MIZOKAMI; KAWAKUBO-YASUKOCHI; HIRATA, 2017), sendo até então considerado um órgão de sustentação e estrutural, que apóia o movimento do corpo e protege os órgãos. Entretanto, um numero crescente de estudos tem mostrado que ele também é um órgão com funções endócrinas ativas, e tem como principais hormônios para essa ação a Osteocalcina Não carboxilada (LEE *et al.*, 2007) e o fator de crescimento de fibroblastos 23 (SHIMADA *et al.*, 2004).

A ação da osteocalcina é descrita como uma via de importância para a fertilidade em machos de camundongos, sendo sua ação descrita tanto de forma direta, com a osteocalcina agindo diretamente nas gônadas e favorecendo a ativação do fator de transcrição CREB (KARSENTY; OURY, 2014; OURY *et al.*, 2011), quando indiretamente por ter uma ação bastante importante na produção de insulina nas células β pancreáticas (KARSENTY; OURY, 2014). Porém, pouco se sabe da sua ação na esteroideogênese ovariana e mais especificamente nas células da teca. Fatores *in vivo* como peso do ovário, morfologia do útero, número de folículos e níveis circulantes de hormônios esteroides foram avaliados em camundongos sem haver diferenças (OURY *et al.*, 2011), mas estudos a nível celular e em espécies monovulatórias não são relatados na literatura.

Qualquer que seja o tecido de ação canônica da osteocalcina, ela precisa do receptor acoplado a proteína G família C grupo 6 membro A (GPCR6A). Esse receptor foi descrito em

diversos tecidos e diversas espécies, sendo sua expressão nos ovários apenas retratado em camundongos (CLEMMENSEN *et al.*, 2014).

Levando em conta a hipótese de que osteocalcina possa também ter um papel na produção de androgênios ovarianos, conduzimos um estudo onde avaliamos inicialmente a existência de receptores GPCRA6 de osteocalcina em células ovarianas bovinas, e , sequencialmente , realizamos o tratamento de células da teca bovina com doses fisiológicas e supra-fisiológicas de osteocalcina ao longo de 24 horas analisando a expressão de genes chaves da esteroidogênese e níveis de testosterona em meio de cultura.

2. HIPÓTESE

A osteocalcina pode interferir na esteroidogênese ovariana (células da teca) através de receptores GPRC6A.

3. OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS:

Avaliar o impacto do tratamento com osteocalcina (não-carboxilada) na nas células da teca e sua ação na esteroidogênese ovariana.

3.2 ESPECÍFICOS:

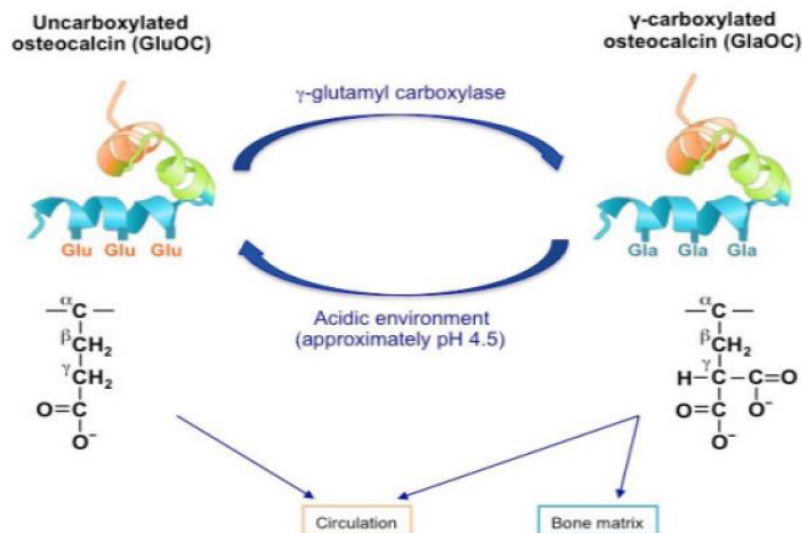
- Comparar os níveis de androstenediona e testosterona produzidos por células da teca bovina *in vitro* submetidas a tratamento com osteocalcina humana (não-carboxilada).
- Avaliar nas células esteroidogênicas a expressão por RT-PCR de genes de interesse (receptor androgênico, STAR, CYP11A1, CYP17A1) nas células da teca

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 OSTEOCALCINA

A osteocalcina é um pequeno peptídeo composta por 46-50 aminoácidos variando de espécie para espécie, sendo ele uma das proteínas sem colágeno mais abundantes no osso codificada pelo gene BGLAP e sintetizada principalmente pelos osteoblastos durante a formação óssea (FERRON *et al.*, 2008; HAUSCHKA *et al.*, 1989). A osteocalcina é modificada pós-tradução em três resíduos específicos de glutamato, nas posições 17, 21 e 24, por γ -glutamil carboxilase com vitamina K como cofator. Sendo essa modificação necessária para que a osteocalcina passe da forma de não osteocalcina carboxilada para osteocalcina carboxilada (Figura 1) (HAUSCHKA *et al.*, 1989; MIZOKAMI; KAWAKUBO-YASUKOCHI; HIRATA, 2017; MORRIS *et al.*, 1995). Até o momento, apenas a não carboxilada foi relatada podendo sinalizar como hormônio (FERRON *et al.*, 2008).

Figura 1 – Modificação pós-tradução da osteocalcina.



Fonte:(MIZOKAMI; KAWAKUBO-YASUKOCHI; HIRATA, 2017)

A osteocalcina não carboxilada age se unindo ao receptor ligado a proteína G da família C grupo 6 membro A (GPRC6A) (DIAZ-FRANCO; LEON; VILLAFAN-BERNAL, 2019). Independente do tecido que o GPRC6A é expresso, onde ele é funcionalmente ativo, ou

expresso, ou apenas sendo descobertas algumas de suas funções, fica claro que varias células e tecidos precisam dessa proteína, como reportado por (PI *et al.*, 2016), ratos que não expressavam o gene GPRC6A no pâncreas tinham menor conteúdo de insulina, menor peso pancreático, menor numero de ilhotas pancreáticas, menor expressão de mRNA de insulina.

4.1.1 Funções endócrinas da osteocalcina não carboxilada

As funções endócrinas descritas da osteocalcina são varias, sendo elas a secreção de insulina e proliferação de células β pancreáticas, também atua auxiliando a secreção de adiponectina pelo tecido adiposo, melhorando assim a sensibilidade de insulina em camundongos. Outra atuação que já foi relatada da osteocalcina seria a redução de massa gorda e aumenta o consumo de energia, pelo aumento da expressão de alguns genes como a β -oxidação (Ppara e Foxa2) e na cadeia de transporte de elétrons (Atp5a1, Atp5b, Mtdnd2, Cox e Cyc1). Essas foram as primeiras evidencias das funções da osteocalcina nos metabolismos energéticos, lipídico e do carboidrato. (LEE *et al.*, 2007).

No fígado de camundongos, a osteocalcina regula positivamente a expressão de genes antioxidantes, como *Cat*, *Sod*, e *Gpx*, que codificam a catalase, superóxido desmutase e a glutationa peroxidase. Além disto, a osteocalcina também dimiu os triglicerídios e remove os danos histológicos de fígados de camundongos com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (FERRON *et al.*, 2012).

Na musculatura esquelética, a função da osteocalcina após se ligar ao seu receptor, aumentar o catabolismo de ácidos graxos e glicose durante o exercício, que, enquanto isso ocorre, o musculo libera interleucina-6, que modula a secreção de osteocalcina não carboxilada nos ossos, fazendo a quantidade de osteocalcina dobrar durante os exercícios, assim que a insulina atinge seu ponto mínimo e com isso aumentando a produção hepática de glicose e de ácidos graxos nos adipócitos. Sendo assim, a osteocalcina age na adaptação do corpo durante o exercício e auxilia a manter a massa muscular (MERA *et al.*, 2017).

A interação da osteocalcina pode ser possível, pois foram identificados receptores GPRC6A nos anéis aórticos de ratos, que se sugere que tenha um efeito vasodilatador, pelo modulação de canais iônicos, que gera hiperpolarização dos miócitos (WEI *et al.*, 2014).

No cérebro, a osteocalcina não carboxilada tem vários efeitos, tanto indiretos como diretos, que inclui a síntese de hormônio do crescimento (GH). Ela também tem papel fundamental na memória, aumento e diminuição da ansiedade, onde foi identificado um novo

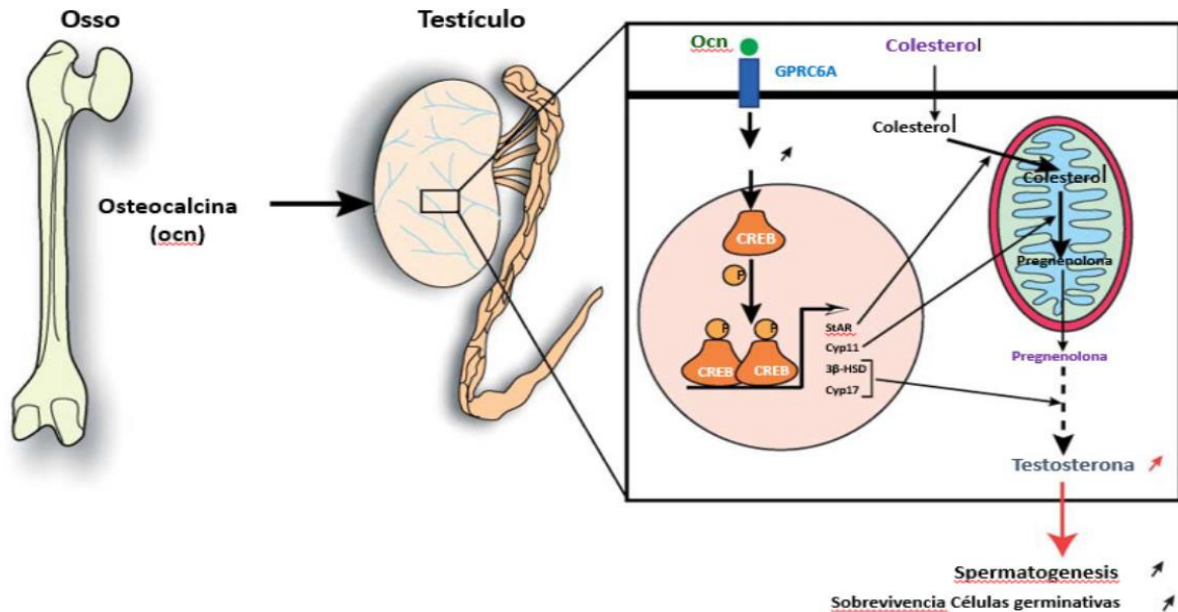
receptor que pode se ligar a osteocalcina, o GPR158 (KHRIMIAN *et al.*, 2017). Além disto, a memória e o aprendizado do animal parecem estar diretamente envolvidos com a osteocalcina, especialmente pelo fato de que camundongos com baixos níveis de osteocalcina tem cérebros consideravelmente menor, maior índice de ansiedade e declínio cognitivo (OBRI *et al.*, 2018).

4.1.2 Função da osteocalcina no testículo

A regulação da remodelação óssea pelas gônadas já é bem conhecida e por sua vez, sugere que o osso também pode, por meio de uma função endócrina, regulando metabolismo energético e reprodução de forma coordenada. O eixo hipotálamo-pituitario é a principal via endócrina para a regulação da fertilidade do macho, no qual o LH favorece a biossíntese de testosterona, entretanto, sabe-se que a osteocalcina tem uma função fora desse eixo (KARSENTY; OURY, 2014).

Nos testículos, foi relatado em um experimento que a osteocalcina aumenta a produção de cAMP (CREB) no testículo. Isso sugeriu que, a ação da osteocalcina se dá quando ela se liga aos receptores GPRC6A nas células de Leydig para induzir a síntese da testosterona (PI *et al.*, 2008), a ativação da CREB por sinalização da osteocalcina favorece a expressão de enzimas chave na biossíntese de testosterona nas células de Leydig, como o 3β -HSF, STAR, CYP11A1 e CYP17A1 (Figura 2) (OURY *et al.*, 2011). A osteocalcina também age pelo eixo pâncreas-osso-testículo que regula algumas funções reprodutivas masculinas através da insulina, fazendo com que haja uma produção de testosterona paralela e independente do eixo hipotálamo-hipófise-testículo (KARSENTY; OURY, 2014).

Figura 2 – Ação da osteocalcina no testículo.



Fonte: modificado de (KARSENTY; OURY, 2014)

4.2 CÉLULAS DA TECA E A ESTEROIDOGÊNESE

As células da teca são encontradas quando os folículos apresentam duas ou mais camadas de células da granulosa. As células progenitoras da teca indiferenciadas não expressam enzimas esteroidogênicas nem receptores de LH, indicando que o início da diferenciação dessas células é independente de gonadotrofinas (MAGOFFIN; WEITSMAN, 1994). Como as células da teca são associadas somente com folículos em crescimento, acredita-se que o próprio folículo produza fatores sinalizadores para o estroma recrutar células para a formação da teca (YOUNG; MCNEILLY, 2010).

Os hormônios esteroidogênicos são responsáveis pela regulação de vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, que dura desde a vida fetal até a adulta. Todos os hormônios esteroides são sintetizados a partir do colesterol. Com o isolamento de algumas das principais enzimas da esteroidogênese foi possível realizar a clonagem de muitos dos seus cDNAs e genes, mostrando que havia menos genes que reações esteroidogênicas, com isso, foi descoberto que uma mesma enzima faz a catalise de algumas reações em vários tecidos diferente onde ocorrem as esteroidogêneses (MILLER, 1988).

A esteroidogênese ovariana pode ser considerada mais complexa porque as etapas enzimáticas são divididas por etapas em duas células diferentes, sendo elas as células da teca e da granulosa, que ficam envoltas do oócito e formam o folículo. Além disso, os padrões de esteroidogênese variam durante o ciclo: o estradiol é o principal produto na fase folicular e a progesterona é produzida na fase lútea. Isso ocorre pelo fato das células da granulosa não apresentarem a enzima CYP17A1 (VOUTILAINEN *et al.*, 1986).

A síntese de androgênios ocorre em resposta a diversos estímulos. Em mamíferos, as células da teca respondem positivamente em resposta ao pico de LH, estimulando a produção de andrógenos e a expressão gênica de StAR e de outras enzimas esteroidogênicas como CYP11A1, HSD3B2 e CYP17A1 (BAIRD; SWANSTON; MCNEILLY, 1981; BAIRD; SWANSTON; SCARAMUZZI, 1976; CAMPBELL; BAIRD; WEBB, 2004; MAGOFFIN; WEITSMAN, 1993c, 1993a, 1993b; RONEN-FUHRMANN *et al.*, 1998).

Após o colesterol adentrar a célula, ele é transportado para dentro da STAR) em resposta ao pico de LH e então é convertido para pregnenolona pela enzima CYP11A1 (MILLER; GELLER; ROSEN, 2007). A pregnenolona, após ser formada, pode ser transformada em P₄ pela HSD3B2; além desta transformação, ela também pode ser convertida em 17 α -hidroxipregnenolona pela enzima CYP17A1 nas células da teca (STOKLOSOWA, 1989).

A CYP11A1 é uma enzima limitante para a produção de esteroides, por isso, a regulação dos seus genes determina a capacidade quantitativa das células esteroidogênicas (MILLER; GELLER; ROSEN, 2007). Enquanto a enzima CYP11A1 é um regulador quantitativo da esteroidogênese, o regulador qualitativo é a enzima CYP17A1, que catalisa 17 α -hidroxilase e 17,20-liase (AUCHUS; MILLER, 1999). Finalizando, isoenzimas da 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase podem converter androstenediona em testosterona (SIMPSON *et al.*, 1994).

4.3 RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G FAMÍLIA C GRUPO 6 MEMBRO A (GPCR6A)

A comunicação entre o interior e o exterior das células é essencial para que ela sobreviva. Uma classe essencial de proteínas, especializada para realizar a transdução de um sinal, são os receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Sua família contém mais de 800 subtipos em humanos. O GPCR classe C, grupo 6, membro A (GPCR6A) pertence aos GPCRs não olfativos como parte dos receptores de classe C, que foi descrito pela primeira vez por (WELLENDORPH; BRÄUNER-OSBORNE, 2004).

Sabe-se até hoje, que os únicos ligantes ao GPRC6A é a osteocalcina e a testosterona usando testes genéticos *in vivo*, porém, *in vitro* alguns outros ligantes já foram encontrados. O receptor é expresso em vários tecidos de animais, incluindo humanos, varia espécies de chimpanzés e pequenos animais, incluindo cérebro, pulmão, baço, coração, rins, pâncreas, musculo esquelético, placenta, fígado, ovário, testículo, leucócitos, monócitos e adipócitos (CLEMMENSEN *et al.*, 2014).

Entretanto, o ortólogo do GPRC6A pode se localizar retido intracelularmente em alguns animais, e em outros, como peixes, é expresso na superfície celular. Essa retenção intracelular ocorre em portadores de uma inserção/deleção no exon 2, que faz acontecer um códon de parada mais cedo na sequência do receptor no amino ácido que fica na posição 57, levando a um receptor não funcional. Isso é mais comum em populações da Europa, já na África aparece uma maior porcentagem de receptor funcional em suas populações, mas maiores estudos devem ser feito para confirmar essa ultima afirmação (JØRGENSEN *et al.*, 2017).

A funcionalidade do receptor GPRC6A pode ser dependente de algum mecanismo de regulação exclusivo do tecido, o que também ocorre em outros receptores que tem função e expressão específica do tecido regulado por splicing alternativo (KATJA; EICHELBAUM; BURK, 2004). O RNAm isoforme1 do GPRC6A é altamente expresso no cérebro, musculo esqueletico, testículo e leucócitos. Sua expressão é mediana no fígado, coração, rins e baço e expresso pouco no pulmão, pâncreas, adipócitos, placenta e ovário. Os isoformes 2 e 3 são menos expressos (WELLENDORPH; BRÄUNER-OSBORNE, 2004). Porém, como já foi comentado algumas funções da osteocalcina, nem sempre sua expressão gênica esta diretamente ligada com a importância da ação da ligação entre a osteocalcina e o GPRC6A, levando também a considerar que possa haver algum outro receptor que possa se ligar a osteocalcina, para que ela exerça sua função no tecido em que se localiza o receptor.

5. ARTIGO Potential Role of Osteocalcin on Ovary Through Activation of the Steroidogenic Pathways

Matheus Colpo Spricigo¹, Lady Katerine Serrano Mujica¹, Alfredo Quites Antoniazzi¹, Valerio Marques Portela¹ and Fabio Vasconcellos Comim¹

¹ Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

* Corresponding author: fabio.comim@ufsm.br

Keywords: theca, osteocalcin, bovine ovaries, steroidogenesis, CYP17

Abstract

Osteocalcin, also known as bone gamma-carboxy glutamic acid-containing protein (BGLAP), is a small (49-amino-acid) noncollagenous protein hormone secreted by osteoblasts usually reported as a marker of bone formation. More recently, other roles for osteocalcin in insulin secretion and sensibility have been suggested, although its impact on the ovarian steroid secretion remains obscure. Therefore, the present study aims to investigate the presence of osteocalcin receptor (GPCR6A) in the granulosa and theca cells of the bovine ovary and the possible effect of osteocalcin on steroidogenic enzymes. Our results indicate, for the first time, the presence of the osteocalcin receptor GPCR6A in theca cells and its absence or very low expression in the granulosa cells. After treatment with non-carboxylated osteocalcin (100ng/ml), a significant effect size on the key steroidogenic enzymes (CYP17A1, CYP11A1) and protein (STAR) was observed in the first hour (but not 24-hour) only in the presence of co-treatment with luteinizing hormone (LH). Lower doses of non-carboxylated osteocalcin (1ng/ml) were not effective to influence these enzymes.

Osteocalcin represents a novel and intriguing molecule with a potential bone-gonadal function. Evidence from the present study shows theca cells as the key effector of osteocalcin, based on its impact on androgen machinery. Most importantly, this action of osteocalcin is synergic and LH-dependent. Further studies *in vitro* and *in vivo* would clarify the real role of osteocalcin on steroidogenesis.

Introduction

Osteocalcin is a bone-derived hormone originated by osteoblasts and which regulates bone maturation. Osteocalcin exists in two forms: carboxylated (form less active and usually in lower circulating levels), and non-carboxylated osteocalcin, more active form and higher levels in the blood. Both osteocalcins act through its specific receptor, the GPCR class C,

group 6, member A (GPCR6A) who belongs to non-olfactory GPCRs as part of class C receptors (CLEMMENSEN *et al.*, 2014; DIAZ-FRANCO; LEON; VILLAFAN-BERNAL, 2019; FERRON *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2007), although some ligand action also occurs at probable G-protein coupled receptor 158 (GPCR158). The main transcriptional effector of GPCR6A is the CREB (1,4).

In the past few years, osteocalcin has gained attention due novel and remarkable endocrine functions described, such as pancreatic insulin secretion, control of energy expenditure and testicular androgen production. (FERRON *et al.*, 2008; KARSENTY, 2017; LEE *et al.*, 2007). Previous studies specially in rodents and humans have also identified the presence of osteocalcin receptors in the gonads, suggesting a new bone- metabolic -gonadal axis, particularly in the male. Despite its intriguing connections, little is known about how osteocalcin acts in the ovary, in special, at its different compartments (theca and granulosa cell layers).

Evidence from few studies in the literature has point out an important role of osteocalcin in the testis physiology. In the elegant study of Oury F et al (KARSENTY; OURY, 2014), testicular explants cultured in medium from osteoblasts (with osteocalcin) produced a significant increase in testosterone secretion. Moreover, mice with the absence of the transcriptional effector of osteocalcin, Creb (Creb Leydig^{-/-}) exhibit reduced testis volume and lower quality of sperm and testosterone levels. In the same study, mice ovaries explant cultured in medium from osteoblasts exhibit a non significant increase in testosterone levels. Interestingly, female transgenic mice (Ocn ^{-/-}) without osteocalcin have no changes in fertility or ovary morphology, meaning that osteocalcin may be more important in the ovary as a co-factor. there is lack of information about other possible roles of osteocalcin in other mammals or even at specific cells of the ovary.

The study proposal aims to explore, for the first time, the presence of osteocalcin receptor (GPCRA6) and effects of non-carboxylated osteocalcin in the granulosa and theca cells from bovine ovaries.

Material and Methods

Primary culture of bovine theca cells and treatment with osteocalcin

Ovaries from adult non-pregnant cattle were obtained from a Brazilian slaughterhouse (Frigorífico Silva, Santa Maria, Rio Grande do Sul, BR). The theca cells were isolated by ovaries with more than 10mm of diameter and apparently healthy, with good vascularization, translucent follicular liquid, and residual CL (diameter with less than 1cm) or absent, lowering the utilization of the atresic follicles. They were collected and transported in warm medium (DMEM/F12 with Penicillin, 100 µg/ml, and Streptomycin, 0.5 µg/ml at 38°C) to the laboratory, where the ovaries were dissected and large antral follicles isolated. Theca cell isolation and culture procedures were performed as previously described, involving a series of digestion and filtering steps (COMIM; HARDY; FRANKS, 2013; STEWART *et al.*, 1995). After isolated (and with a viability not inferior to 90% established by Trypan Blue method), theca cells were plated at 38.5 °C and 5% CO₂ at a density of 1.5×10^5 cells per 1.9 cm². Subsequently, the DMEM/F12 medium containing 1µg/ml Transferrin, 1 ng/ml Selenium, 1 µg/ml Linoleic acid, 100 UI/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0.5 µg/ml Gentamicin) was changed, and the theca cells were transferred to 96-plastic-well plates at density of 3×10^3 cells per 0.33 cm² and treated with synthetic human decarboxylated osteocalcin (Osteocalcin-189H) from Creative BioMart, New York, USA (with a concentration of 1 and 100 ng/ml) for 24 hour . Samples were obtained at 1 and 24 hours.

Primary culture and obtention of bovine granulosa cells.

The primary culture of granulosa cells will be the study model for evaluating the effects of osteocalcin on ovarian steroidogenesis. The granulosa cells will be obtained from bovine ovaries purchased from a local slaughterhouse. The ovaries will be collected in pairs and previously selected with the presence of small CL (less than 1 cm in diameter) or absent, containing, still, larger follicles of approximately 10 mm in diameter. The transport to the laboratory will be carried out in 0.9% saline solution with penicillin (100 IU / ml) and streptomycin (100 ugs/ml) at 22-25 ° C. Upon arriving at the laboratory, wash the ovaries in saline solution, 70° alcohol and again in saline. Place 70% alcohol and warm saline in a water bath to wash the ovaries upon arrival at the laboratory, approximately 30 min before the arrival of the ovaries by heating the DMEN / F12 medium to 37 ° C for flushing and cell culture. considering that the total time elapsed from the collection of the ovaries and the beginning of the culture will not exceed 3 hours. After isolation by flushing with PBS, the cells will be centrifuged at 200.g for 5 min with PBS solution three times and resuspended in 2ml of culture medium containing DMEM-F12 supplemented with BSA (0.1%), insulin (10ng / mL), androstenedione (10⁻⁷M), FSH (1ng / ml), penicillin (100UI / mL), streptomycin (100µg / mL) and amphotericin. The cells will be filtered to then count and estimate cell viability using the 0.4% trypan blue stain. The cells will be grown at a density of 5x10⁴ viable cells / well in culture plates (96 wells) in the greenhouse at 39°C and 5% CO₂ for 12, 24, and 48 hours.

RNA quantification and RT-PCR

The total RNA of the theca and granulosa cells grown in vitro was obtained using Trizol® (Life Technologies, Foster City, CA, United States), following the manufacturer's instructions. After that, the samples were treated with DNase I™ (Life Technologies, United States) and RNA samples were quantified in a spectrophotometer NanoDrop (ND1000, Thermo Scientific) with

a wavelength of 260nm. Total RNA (1µg) was treated with DNaseTM (DNase Amplification Grade I - Invitrogen) at 37°C within 5 minutes to digest any contaminating DNA. The reverse transcription reaction to cDNA was performed according to the manufacturer's instructions using the iScript cDNA Synthesis KitTM (Bio-Rad). After obtained, cDNAs were kept in a –20°C freezer until the gene expression was checked. Gapdh (NM_017008.4) was used as a reference gene. Details of primers and genes of interest used in this study are disposed of in the supplemental Table 1.

Table 1. Primers used in the study

Gene	Sequence	Reference or accession number
GAPDH	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: GGTCATAAGTCCCTCCACGA	NM_017008.4
CYP17A1	F: CCATCAGAGAAGTGCTCCGAAT R: GCCAATGCTGGAGTCAATGA	NM_174304.2
STAR	F: CCCAGCAGAAGGGTGCATC R: TGCGAGAGGACCTGGTTGAT	Orisaka <i>et al.</i> (2006) (9)
CYP11A1	F: CTTGCACCTTTCTGGCTAGG R: AAGGGGAAGAGGTAGGGTGA	Orisaka <i>et al.</i> (2006) (9)
CYP19A1	F: GTGTCCGAAGTTGTGCCTATT R: GGAACCTGCAGTGGGAAATGA	NM_174305.1
GPRC6A	F: GGAAUACAGUUCUGGGCATT R: UUGCCCAGAACUGUAUUCCTT	Li <i>et al.</i> (2019) (10)

The qRT-PCR reactions were performed in duplicate in a total volume of 20 μ L (including 10 ng of cDNA, 10 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix, and 1 μ L of the assays) and were carried out on CFX384 real-time PCR systems (Bio-Rap) (Hercules, CA). The cycle conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 45 cycles of 95°C for 10 s, and 60°C for 1 min. The data were analyzed using Bio-rap CFX Manager Software (version 3.0), and Ct values were transformed to quantities using the comparative Ct method (DDCt, Life Technologies), as previously described Serrano Mujica, 2017 (SERRANO MUJICA *et al.*, 2017).

Statistical Analysis

The statistical analysis and graphs were performed using the software GraphPad Prism 6.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Comparisons among the two groups were performed using Student's t test. In the absence of a normal distribution, the data were analyzed using a Mann-Whitney test. For the analysis of more than 2 groups having normal data distribution, the ANOVA test was performed. Significance was assumed at $p < 0.05$. Additionally, data were also analyzed by Cohen's effect size analysis and effect size with Cohen's d value of 0.8 and above considered as large magnitude differences are reported. This analysis has been suggested to the study of small sample sizes to reject the null hypothesis (PADMANABHAN *et al.*, 2015)

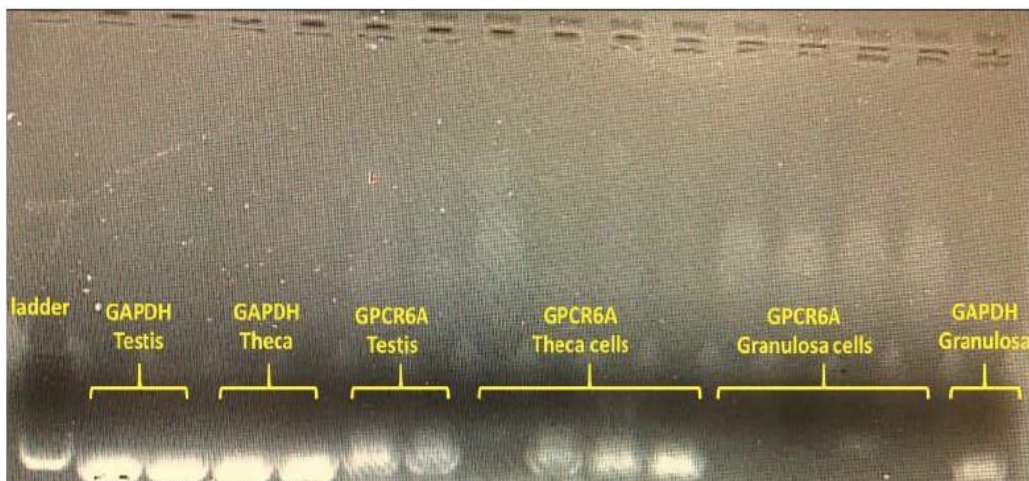
Results

GPC6a mRNA are expressed in theca cells, but not in granulosa cells.

The theca cells and the granulosa cultures were based on previous protocols in vitro looking the purity of both cells using Rt-PCR (RIGO *et al.*, 2015). One of the established ways to exclude co-contamination is the absence of CYP17A1 (P450c17) expression and the presence of CYP19A1 (aromatase) in granulosa cells cultured (or obtained from the follicular fluid) and the opposite (presence of CYP17A1 and absence of CYP19A1) in theca cells culture.

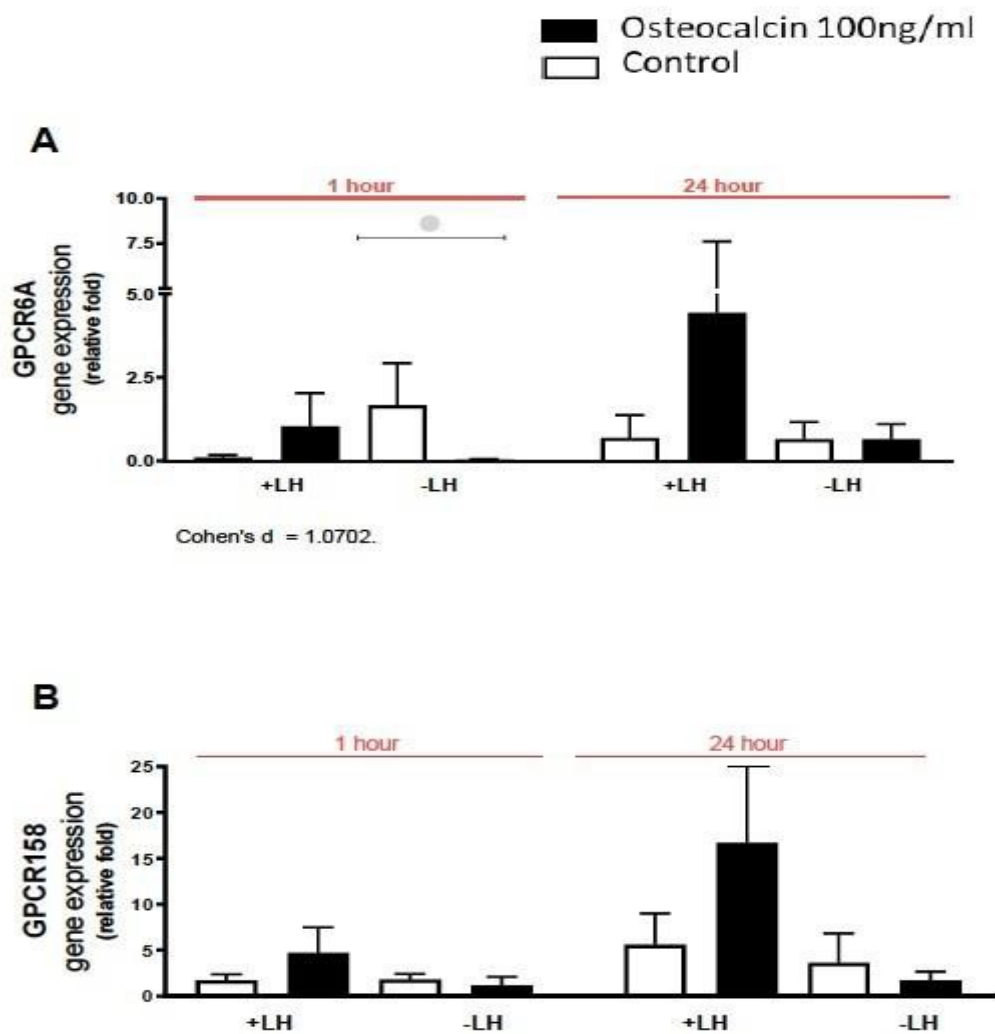
As shown in Figure 1, just theca cells in culture expressed GPCR6A (bovine testis were used as a positive control). No relevant expression for GPCRC6A was identified in granulosa cells cultured or extracted from the follicular fluid of large follicles. The other receptor of osteocalcin (GPCR158) was not observed neither in the theca nor in the granulosa cells (data not shown).

Fig 1. Expression of GPCRA6 in the bovine ovary: theca and granulosa cultivated cells



We cannot see an increase in GPCR6A expression in theca when treated with osteocalcin, since the expression remained the same in the first hour, and this expression gets lowered 24 hours after the treatment, this can be seen in the figure 2.

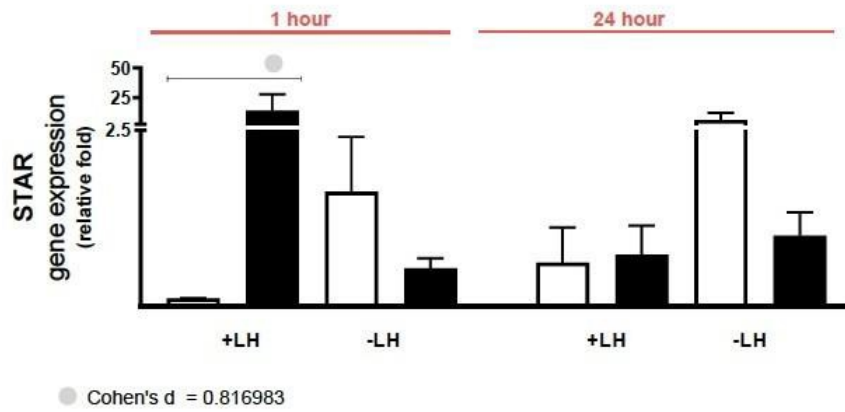
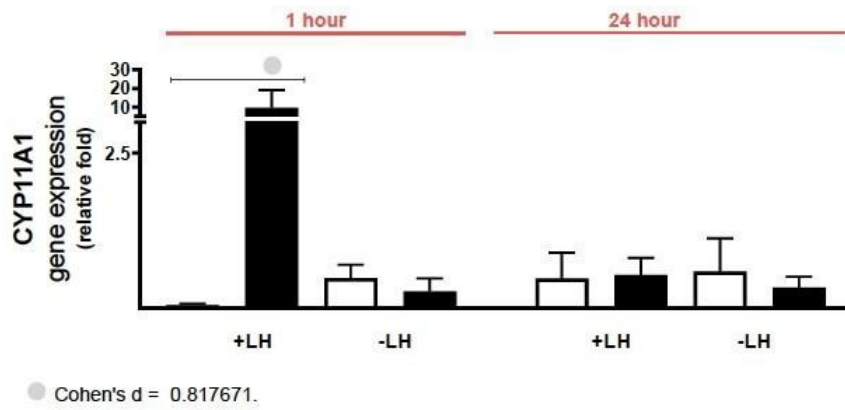
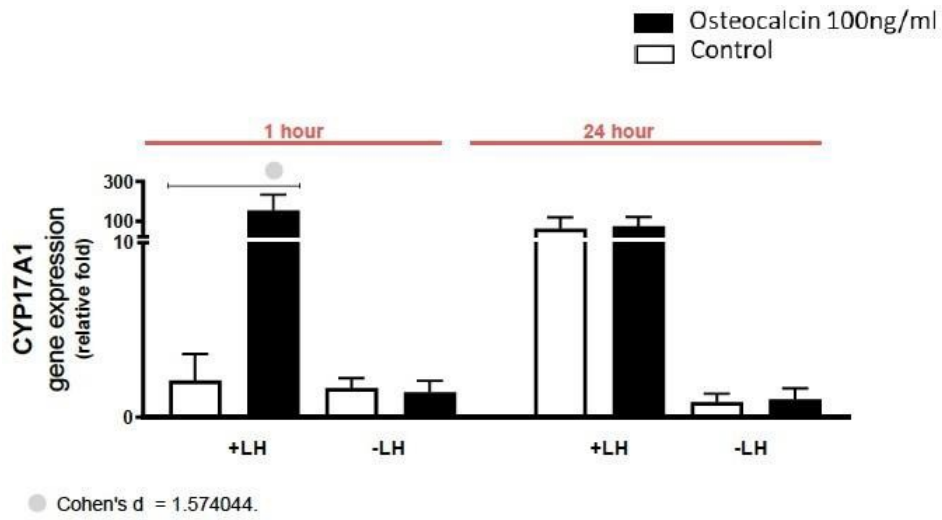
Fig 2. mRNA of GPRC6A and GPCR158 in theca cultivated cells after non-carboxylated osteocalcin treatment.



Osteocalcin have a synergic response with LH and increases mRNA CYP17A1, CYP11A1 and STAR expression in the first hour of cultivated theca cells

Figure 3 exhibits the impact of non-carboxylated osteocalcin on steroidogenic enzymes. As can be seen, a remarkable effect of osteocalcin is observed on CYP17A1, CYP11A1 and STAR, key players in the beginning and development of steroid production. However, the increased effect size was observed only at 1 hour after osteocalcin administration and in the presence of co-treatment with LH.

Fig 3. m R N A e xpression of CYP17A1, CYP11A1 and STAR in the first hour and after twenty-four after non-carboxylated osteocalcin in cultivated theca cells



Discussion

Recent evidence shows clearly that the expression of the GPCR6A exists in the ovary and testis, but all the studies are mainly focused on female mice or humans, and its expression is related to the whole ovary. In our study, we explored for the first time the presence of GPCR6A and GPCR158 in the two main compartments of the bovine ovarian follicle: the granulosa cells and the theca cells. In addition, we showed that the bovine testis has a consistent expression of GPCRA6 (CAMERINO *et al.*, 2016; KARSENTY; OURY, 2014; OURY *et al.*, 2011, 2013). In the ovary, GPCR6A was identified only in theca cells of healthy follicles.

Following the receptor identification, we performed a functional analysis. In the absence of co-treatment with LH, osteocalcin has no impact on the steroid machinery. These results agreed with a novel transgenic mouse without osteocalcin receptor and which exhibits normal fertility and gonadal function. Based on both results it is reasonable to assume that osteocalcin is not essential to reproduction.

However, after treatment with osteocalcin (100 ng/ml) and LH we could observe a significant increase in mRNA CYP17A1, CYP11A1, and STAR genes in 1 hour. The meaning of these results (more than ten times) needs to be better explored in future studies. Since the levels of androgens in the cell culture medium were not addressed, which is a great limitation of our study, this interesting finding should be put in perspective. Another limitation was based on the absence of an evaluation of genes before 1 hour. Once GPCR6A activation can occur before its 10 or 20 minutes, is not possible to assume that osteocalcin was not able to stimulate its own receptor.

Maybe, the most important aspect of this study was to show the remarkable stimulation of steroidogenic enzymes and STAR with osteocalcin in the presence of a co-treatment with LH in a monovulatory mammal. This new aspect may be considered a link between bone metabolism and androgen secretion with potential applications to Medicine. Its relationship

with metabolic disease (insulin resistance) and obesity may be better explored. Other relevant considerations are related to the differences between carboxylated and non-carboxylated osteocalcins. Is possible that the effects on the receptor may diverge between these two forms of osteocalcin, which needs to be addressed properly.

Conclusions

To conclude, our preliminary results show for the first time the presence of mRNA of GPCRA6 in the bovine theca demonstrating in vitro a synergic effect of the non-carboxylated osteocalcin with LH to increase the gene expression of the key steroidogenic enzymes (CYP17A1 and CYP11A1) and protein (STAR). Future research on this field needs to be performed to describe more consistently the role of canonical and non-canonical pathways in the ovary.

Acknowledgments and Funding

Capes Foundation sponsored the scholarship of MCS; this research not received any specific grant from funding agencies in the public, commercial or non-profit sectors.

Author's contribution:

Study Design: FVC; Study Conduct: LKSM, MCS; Data Collection and Analysis of the data: FVC,AQA,VP;Data Interpretation and critical reading of the manuscript: FVC, MCS; drafting manuscript: FVC and MCS

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* [Internet]. 2007;130(3):456–69.
2. Clemmensen C, Smajilovic S, Wellendorph P, Bräuner-Osborne H. The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPRC6A) receptor: From cloning to physiological function. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2014;171(5):1129–41.
3. Diaz-Franco MC, Franco-Diaz de Leon R, Villafan-Bernal JR. Osteocalcin-GPRC6A: An update of its clinical and biological multi-organic interactions (Review). *Mol Med Rep* [Internet]. 2019;19(1):15–22.
4. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008;105(13):5266–70.
5. Karsenty G. UPDATE on the BIOLOGY of OSTEOCALCIN. *Endocr Pract*. 2017;23(10):1270–4.
6. Oury F, Karsenty G,. Regulation of male fertility by bone-derived hormone osteocalcin. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(2):521–6.
7. Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. Effects of Insulin-Like Growth Factor I and Insulin on Proliferation and on Basal and Luteinizing Hormone-Induced Steroidogenesis of Bovine Thecal Cells : Involvement of Glucose and Receptors for Insulin-Like Growth Factor I and Luteinizing Hormone. *J Anim Sci* [Internet]. 1995;73(12):3719–31.
8. Comim F V, Hardy K, Franks S. Adiponectin and Its Receptors in the Ovary : Further Evidence for a Link between Obesity and Hyperandrogenism in Polycystic Ovary

- Syndrome. *PLoS One*. 2013;8(11):1–9.
9. Orisaka M, Tajima K, Mizutani T, Miyamoto K, Tsang BK, Fukuda S, et al. Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. *Biol Reprod*. 2006;75(5):734–40.
 10. Li X, Li P, Wang L, Zhang M, Gao X. Lysine Enhances the Stimulation of Fatty Acids on Milk Fat Synthesis via the GPRC6A-PI3K-FABP5 Signaling in Bovine Mammary Epithelial Cells. *J Agric Food Chem*. 2019;67(25):7005–15.
 11. Serrano Mujica LK, Bertolin K, Bridi A, Glanzner WG, Rissi VB, de Camargo F de los S, et al. The impact of postnatal leuprolide acetate treatment on reproductive characteristics in a rodent model of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;442:125–33.
 12. Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Herkimer C, Salloum BA, Moeller J, Beckett E, et al. Developmental programming: Prenatal and postnatal androgen antagonist and insulin sensitizer interventions prevent advancement of puberty and improve LH surge dynamics in prenatal testosterone-treated sheep. *Endocrinology*. 2015;156(7):2678–92.
 13. Rigo ML, Dau AMP, Glanzner WG, Martins M, Zanella R, Rizzetti TM, et al. Steroidogenic enzymes mRNA expression profile and steroids production in bovine theca cells cultured in vitro and stimulated with angiotensin II. *Ciência Rural*. 2015;45(4):704–10.
 14. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):796–809.
 15. Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J, et al. Erratum: Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest*. 2013;125(5):2180.
 16. Camerino C, Conte E, Cannone M, Caloiero R, Fonzino A, Tricarico D. Nerve growth

factor, brain-derived neurotrophic factor and osteocalcin gene relationship in energy regulation, bone homeostasis and reproductive organs analyzed by mrna quantitative evaluation and linear correlation analysis. *Front Physiol.* 2016;7(OCT):1–9.

Legends

Fig 1. Expression of GPCRA6 in the bovine ovary: theca and granulosa

This agarose gel electrophoresis of RT-PCR products shows the presence of GAPDH in all types of cells studied, while GPCRA6 was mainly expressed in testis and theca cells, being practically absent in granulosa cells.

Fig 2. Expression of GPRC6A and GPCR158 in theca cells after non-carboxylated osteocalcin treatment.

(A) GPRC6A gene expression did not reach a statistical difference after treatment with 100ng/ml of osteocalcin in 1 and 24 hour in the presence of LH, although a significant effect size towards a reduction in GPCR6A was identified in theca cells culture without LH.

(B) No differences were observed regarding the expression of GPCR158 at 1 and 24 hours after treatment with osteocalcin 100ng/ml

Fig 3. Expression of CYP17A1, CYP11A1 and STAR in the first hour and after twenty-four after non-carboxylated osteocalcin

In (A) A significant effect size was observed in CYP17A1 of bovine theca cells 1 hour after treatment with 100 ng/ml of non-carboxylated osteocalcin in the presence of LH. Similar figures were identified with CYP11a1 (B) and the expression of STAR (C) with co-administration of LH.

Table 1. Primers used in the study

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nosso projeto experimental explorou as ações reprodutivas da osteocalcina não carboxilada em ovário bovino. Parte da escolha deste modelo deveu-se ao fato dos bovinos serem animais monovulatórios semelhantes aos humanos, e pela validação do sistema de cultivo de teca humana .

Inicialmente, foi identificado, pela primeira vez na teca bovina, a presença do receptor de osteocalcina o GPCRA6. Estes resultados são interessantes pois contrastam com a ausência do mesmo nas células da granulosa.

Foram testadas diferentes doses de osteocalcina, em concentrações baixas (1ng/ml) e supra-fisiológicas(100 ng/ml) e comparando-os a estimulação com e sem hormônio luteinizante (LH). Embora limitados, nossos resultados demonstram que parece haver alguma ação da osteocalcina na primeira hora após o tratamento, aumento a expressão de enzimas esteroidogênicas chaves como a STAR, CYP11A1 e CYP17A1 de forma sinérgica com o uso de LH (100 ng/ml).

Estudos futuros empregando osteocalcina carboxilada ou outros instrumentos como bloqueadores farmacológicos ou moleculares (SIRNA, CRISPR) poderão auxiliar no entendimento do papel da osteocalcina na produção de androgênios pelo ovário.

REFERÊNCIAS

- AUCHUS, Richard J.; MILLER, Walter L. Molecular modeling of human p450c17 (17 β -hydroxylase/ 17,20-lyase) insights into reaction mechanisms and effects of mutations. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1169–1182, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/mend.13.7.0326>
- BAIRD, David T.; SWANSTON, Ian A.; MCNEILLY, Alan S. Relationship Between LH, FSH, and Prolactin Concentration and the Secretion of Androgens and Estrogens by the Preovulatory Follicle in the Ewe. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 1013–1025, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.5.1013>
- BAIRD, David T; SWANSTON, I; SCARAMUZZI, R J. Release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase. **Endocrinology**, [s. l.], v. 98, n. January, p. 1490–1496, 1976. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/945154>
- BURGER, H. G. Androgen production in women. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 3–5, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/b14632-2>
- CAMERINO, Claudia *et al.* Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and osteocalcin gene relationship in energy regulation, bone homeostasis and reproductive organs analyzed by mrna quantitative evaluation and linear correlation analysis. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 7, n. OCT, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00456>
- CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T.; WEBB, R. Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultured in a serum-free system. **Reproduction**, [s. l.], v. 112, n. 1, p. 69–77, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1120069>
- CLEMMENSEN, C. *et al.* The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPRC6A) receptor: From cloning to physiological function. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 171, n. 5, p. 1129–1141, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.12365>
- COMIM, Fabio V; HARDY, Kate; FRANKS, Stephen. Adiponectin and Its Receptors in the Ovary : Further Evidence for a Link between Obesity and Hyperandrogenism in Polycystic Ovary Syndrome. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1–9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080416>
- DIAZ-FRANCO, Martha Cristina; LEON, Raul Franco-Diaz de; VILLAFAN-BERNAL, Jose Rafael. Osteocalcin-GPRC6A: An update of its clinical and biological multi-organic interactions (Review). **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 15–22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9627>
- FERRON, Mathieu *et al.* Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. **Bone**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 568–575, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.017>
- FERRON, Mathieu *et al.* Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 13, p. 5266–5270, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0711119105>

- HAUSCHKA, P. V. *et al.* Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 990–1047, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.990>
- JØRGENSEN, Stine *et al.* Genetic variations in the human g protein-coupled receptor class C, group 6, member A (GPCR6A) control cell surface expression and function. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 292, n. 4, p. 1524–1534, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.756577>
- KARSENTY, Gerard. UPDATE on the BIOLOGY of OSTEOCALCIN. **Endocrine Practice**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1270–1274, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4158/EP171966.RA>
- KARSENTY, Gerard; OURY, Franck. Regulation of male fertility by bone-derived hormone osteocalcin. **Mol Cell Endocrinol**, [s. l.], v. 382, n. 2, p. 521–526, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.008i>
- KATJA, Arnold A.; EICHELBAUM, Michel; BURK, Oliver. Alternative splicing affects the function and tissue-specific expression of the human constitutive androstane receptor. **Nuclear Receptor**, [s. l.], v. 2, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1478-1336-2-1>
- KHRIMIAN, Lori *et al.* Gpr158 mediates osteocalcin's regulation of cognition. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 214, n. 10, p. 2859–2873, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20171320>
- LEE, Na Kyung *et al.* Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. **Cell**, [s. l.], v. 130, n. 3, p. 456–469, 2007. Disponível em: <https://doi.org/CC>
- MAGOFFIN, Denis A.; WEITSMAN, Stacy R. Differentiation of ovarian theca-interstitial cells in vitro: regulation of 17 alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression by luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. **Endocrinology**, [s. l.], v. 132, n. 5, p. 1945–1951, 1993a. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.132.5.1945>
- MAGOFFIN, Denis A.; WEITSMAN, Stacy R. Effect of insulin-like growth factor-I on cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in ovarian theca-interstitial cells stimulated to differentiate in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 96, n. 1–2, p. 45–51, 1993b. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(93\)90093-Y](https://doi.org/10.1016/0303-7207(93)90093-Y)
- MAGOFFIN, Denis A.; WEITSMAN, Stacy R. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 766–775, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.132.5.8477646>
- MAGOFFIN, Denis A.; WEITSMAN, Stacy R. Insulin-Like Growth Factor-I Stimulates the Expression of 3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Messenger Ribonucleic Acid in Ovarian Theca-Interstitial Cells1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 1166–1173, 1993c. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.5.1166>
- MERA, Paula *et al.* Osteocalcin Signaling in myofibers is necessary and sufficient for Optimum Adaptation To Exercise. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1078–1092, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.004.Osteocalcin>
- MILLER, Walter L. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. **Endocrine Reviews**,

[s. l.], v. 9, n. 3, p. 295–318, 1988. Disponível em:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hlca.193702001158>

MILLER, Walter L.; GELLER, David H.; ROSEN, Mitchell. Ovarian and Adrenal Androgen Biosynthesis and Metabolism. **Androgen Excess Disorders in Women**, [s. l.], p. 19–33, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-179-6_2

MIZOKAMI, Akiko; KAWAKUBO-YASUKOCHI, Tomoyo; HIRATA, Masato. Osteocalcin and its endocrine functions. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 132, n. February, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.001>

MORRIS, D. P. *et al.* Processive post-translational modification. Vitamin K-dependent carboxylation of a peptide substrate. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 270, p. 30491–30498, 1995.

OBRI, Arnaud *et al.* Osteocalcin in the brain: from embryonic development to age-related decline in cognition. **Nat Rev Endocrinol**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 174–183, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cnecr.27633.Percutaneous>

OURY, Franck *et al.* Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 796–809, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.004>

OURY, Franck *et al.* Erratum: Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 125, n. 5, p. 2180, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI81812>

PADMANABHAN, Vasantha *et al.* Developmental programming: Prenatal and postnatal androgen antagonist and insulin sensitizer interventions prevent advancement of puberty and improve LH surge dynamics in prenatal testosterone-treated sheep. **Endocrinology**, [s. l.], v. 156, n. 7, p. 2678–2692, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2015-1235>

PI, Min *et al.* Evidence for osteocalcin binding and activation of GPRC6A in β -cells. **Endocrinology**, [s. l.], v. 157, n. 5, p. 1866–1880, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2015-2010>

PI, Min *et al.* GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, n. 12, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003858>

RIGO, Melânia Lazzari *et al.* Steroidogenic enzymes mRNA expression profile and steroids production in bovine theca cells cultured in vitro and stimulated with angiotensin II. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 704–710, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20240254>

RONEN-FUHRMANN, Tamar *et al.* Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (star) during follicular development in the rat ovary. **Endocrinology**, [s. l.], v. 139, n. 1, p. 303–315, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.139.1.5694>

SERRANO MUJICA, Lady Katerine *et al.* The impact of postnatal leuprolide acetate treatment on reproductive characteristics in a rodent model of polycystic ovary syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 442, p. 125–133, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.015>

SHIMADA, Takashi *et al.* FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 429–435, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1359/JBMR.0301264>

SIMPSON, Evan R *et al.* Aromatase Cytochrome P450, the Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 342–355, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/edrv-15-3-342>

STEWART, R E *et al.* Effects of Insulin-Like Growth Factor I and Insulin on Proliferation and on Basal and Luteinizing Hormone-Induced Steroidogenesis of Bovine Thecal Cells : Involvement of Glucose and Receptors for Insulin-Like Growth Factor I and Luteinizing Hormone. **journal of Animal Science**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 3719–3731, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/1995.73123719x>

VOUTILAINEN, Raimo *et al.* Hormonal regulation of P450scc (20,22-desmolase) and P450c17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 202–207, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jcem-63-1-202>

WEI, Jianwen *et al.* Osteocalcin promotes β -cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. **Diabetes**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 1021–1031, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db13-0887>

WELLENDORPH, Petrine; BRÄUNER-OSBORNE, Hans. Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. **Gene**, [s. l.], v. 335, n. 1–2, p. 37–46, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.03.003>

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, [s. l.], v. 140, n. 4, p. 489–504, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0094>