

---

## TRABAJO ORIGINAL

---

Premio en el Área Clínica en el X Congreso FASEN - Córdoba 2014

# Correlación entre osteocalcina, insulinoresistencia, insulinosensibilidad y metabolismo de la glucosa en adultos mayores con síndrome metabólico

## Correlation between Osteocalcin, Insulin Resistance, Insulin Sensitivity and Carbohydrate Metabolism in an Elderly Population with Metabolic Syndrome

Musso C<sup>1</sup>, Mingote E<sup>1</sup>, Durante C<sup>1</sup>, Brenta G<sup>1</sup>, Gurfinkiel M<sup>2</sup>, Fossati MP<sup>2</sup>, Martínez M<sup>1</sup>, Nepote A<sup>1</sup>, Fretes O<sup>1</sup>, Schurman L<sup>1</sup>, Sedlinsky C<sup>1</sup>, Faingold C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Endocrinología y Metabolismo, <sup>2</sup>Laboratorio clínico de la Unidad Asistencial Dr. César Milstein. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

---

### RESUMEN

**Introducción:** Recientemente han surgido nuevas evidencias que relacionan el metabolismo óseo con el energético. La osteocalcina es una proteína de la matriz ósea no colágena, sintetizada por los osteoblastos que modula localmente la mineralización ósea, tradicionalmente usada como marcador de formación ósea. Se ha demostrado tanto en modelos "in vitro" como en animales de experimentación que la osteocalcina tiene acción hormonal. Esta proteína tiene la propiedad de regular la insulinosensibilidad, la insulinosécréción y la proliferación de las células beta pancreáticas.

**Objetivo:** Evaluar la existencia de correlación entre los niveles de osteocalcina sérica y marcadores de insulinoresistencia (IR) e insulinosensibilidad en una población de adultos mayores con síndrome metabólico.

**Material y métodos:** En nuestro estudio prospectivo se incluyeron 88 pacientes (68 % mujeres, 32 % hombres, media de edad 73 ± 6 y 74 ± 6 años respectivamente) que concurrieron a los consultorios externos del servicio de Endocrinología y Metabolismo del hospital Dr. César Milstein. Todos cumplían con los criterios diagnósticos de síndrome metabólico del año 2009 de la Federación Internacional de Diabetes (IDF).

Se midieron: osteocalcina sérica, hemoglobina glicosilada (HbA1c), HDL y triglicéridos (TG). Se calcularon QUICKI (Quantitative Insulin Sensivity Check Index) y el índice TG/HDL.

**Resultados:** Los niveles de osteocalcina sérica se asociaron positivamente con HDL ( $r = 0,213$ ,  $p = 0,05$ ) y QUICKI ( $r = 0,212$ ,  $p = 0,05$ ) e inversamente con TG ( $r = -0,218$ ,  $p < 0,05$ ), con el índice TG/HDL ( $r = -0,217$ ,  $p < 0,05$ ) y con HbA1c ( $r = -0,253$ ,  $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** Nuestro estudio mostró que en adultos mayores con síndrome metabólico, los niveles de osteocalcina reducidos se asociaron con un aumento en los índices de insulinoresistencia, una disminución de los de insulinosensibilidad y un peor control metabólico. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:8-13, 2015**

Los autores no poseen conflictos de interés.

**Palabras clave:** osteocalcina, síndrome metabólico, insulinoresistencia, metabolismo hidrocarbonado, adulto mayor

## ABSTRACT

**Introduction:** In recent years there has been increasing evidence about the relationship between bone and energy metabolism. Osteocalcin is a non-collagenous bone matrix protein synthesized by osteoblasts that locally modulates bone mineralization and is traditionally used as a bone formation marker. Osteocalcin has been shown to have hormonal actions both in in vitro models and in experimental animals. This hormone has the property of regulating insulin secretion and insulin sensitivity as well as beta pancreatic cell proliferation.

**Aim:** To evaluate the existence of correlation between serum osteocalcin levels, insulin resistance and insulin sensitivity markers in an elderly population with metabolic syndrome.

**Material and methods:** Eighty-eight elderly patients were included in our prospective study (68 % women, mean age  $73 \pm 6$  ; 32 % men, mean age  $74 \pm 6$ ). They attended the outpatient Endocrinology and Metabolism service at Dr. César Milstein Hospital and met the International Diabetes Federation (IDF) criteria of metabolic syndrome.

Serum Osteocalcin, Glycated haemoglobin (HbA1c), HDL and Triglycerides (TG) were measured. QUICKI and TG/HDL index were calculated.

**Results:** Serum osteocalcin levels were positively associated with HDL ( $r = 0.213$ ,  $p = 0.05$ ) and QUICKI ( $r = 0.212$ ,  $p = 0.05$ ), and inversely associated with TG ( $r = -0.218$ ,  $p < 0.05$ ), TG/HDL index ( $r = -0.217$ ,  $p < 0.05$ ) and HbA1c ( $r = -0.253$ ,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Our study showed that in elderly patients with metabolic syndrome, reduced osteocalcin levels were associated with increased insulin sensitivity, decreased insulin resistance indexes and impaired metabolic control. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:8-13, 2015**

No financial conflicts of interest exist.

**Key words:** osteocalcin, metabolic syndrome, insulin resistance, carbohydrate metabolism, elderly patients

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se puso en evidencia la existencia de una estrecha relación entre el metabolismo energético y el hueso, mostrándose que niveles bajos de osteocalcina circulante se asociaron con la presencia de marcadores de insulinoresistencia. Esta última se define como una respuesta subóptima a la captación de glucosa mediada por insulina en los tejidos, considerándose un predictor para desarrollar diabetes mellitus tipo 2, estando asociada con aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular<sup>(1,2)</sup>.

La osteocalcina, proteína no colágena sintetizada únicamente por el osteoblasto que se encuentra presente en la matriz ósea y en la circulación, tendría un papel protagónico protector en relación al metabolismo hidrocarbonado. Luego de su síntesis, la osteocalcina es carboxilada en tres residuos glutámicos, lo que le confiere una gran afinidad por el mineral óseo lo cual le permite unirse a la hidroxiapatita presente en el hueso mineralizado. Durante mucho tiempo se supuso que la osteocalcina tendría algún efecto modulador de la mineralización ósea, estudios en ratones comprobaron que no era así. Sin embargo, estos animales mostraron un aumento de su masa grasa<sup>(3,4)</sup>. Dado que es una proteína circulante, se

hipotetizó que podría actuar como una hormona regulando algunos aspectos del metabolismo energético. Esto fue demostrado por primera vez en estudios de cocultivo de osteoblastos y células de los islotes pancreáticos u osteoblastos y adipocitos, donde se observó que la presencia de osteoblastos indujo un aumento de la secreción de insulina, la proliferación de las células beta pancreáticas y el aumento de la expresión de adiponectina en adipocitos, mientras que los osteoblastos que no expresaban osteocalcina no indujeron dicho efecto<sup>(5)</sup>. Esta acción de la osteocalcina fue también demostrada “in vivo”. Los animales genéticamente modificados que no expresaban osteocalcina en sus osteoblastos, mostraban una disminución de la expresión y secreción de insulina, así como una disminución de la masa de células beta pancreáticas y de la expresión y secreción de adiponectina por los adipocitos. También se verificó en estos animales una disminución en la sensibilidad a la insulina en músculo, hígado, tejido adiposo y del gasto energético. En este mismo estudio se demostró que la osteocalcina requiere estar decarboxilada o subcarboxilada para cumplir con su función metabólica<sup>(3)</sup>. Estudios posteriores demostraron que es la insulina, a través de su interacción con su receptor en el osteoblasto, quien induce la síntesis de osteocalcina y su posterior decarboxilación y

liberación de la matriz ósea a través del estímulo de la resorción ósea, para cumplir con la comprobada función metabólica. Esta actividad es regulada a través de la defosforilación del receptor de insulina por acción de la enzima tirosina-fosfatasa<sup>(6)</sup>.

En las últimas décadas se han propuesto diferentes métodos para evaluar insulinosensibilidad<sup>(6,7)</sup>. El índice HOMA es un método que determina insulinoresistencia tomando concentraciones basales de glucemia e insulinemia<sup>(8)</sup>. Dado que la concentración de insulinemia de ayuno varía significativamente, esto dificulta establecer valores de corte ideales de insulinemia e índice HOMA<sup>(9)</sup>. Por otra parte, el QUICKI tiene buena correlación con el clamp euglicémico hiperinsulinémico y tiene la ventaja que predice el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2<sup>(10)</sup>. El índice TG/HDL es un marcador de insulinoresistencia, de fácil determinación y presenta una buena correlación con el índice HOMA en adultos. Un valor del índice TG/HDL superior a 3 es un indicador secundario de insulinoresistencia y tiene la ventaja de ser metodológicamente sencillo y económico<sup>(11)</sup>.

Varios estudios clínicos han demostrado a partir de estos conceptos, que la concentración de osteocalcina sérica está asociada positivamente a la secreción de insulina<sup>(7,12)</sup>, a la disminución de la resistencia a la insulina<sup>(13)</sup> y a la concentración de adiponectina sérica<sup>(14)</sup> y negativamente a los niveles de glucosa y a la masa corporal total<sup>(12)</sup>.

El objetivo del presente trabajo es evaluar si existe correlación entre los niveles de osteocalcina sérica y los diferentes marcadores de insulinosensibilidad e insulinoresistencia en una población de adultos mayores con síndrome metabólico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Diseño:** Estudio de cohorte prospectivo no-consecutivo realizado en el Servicio de endocrinología y metabolismo de la Unidad Asistencial Dr. César Milstein. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de nuestra institución. Se reclutaron pacientes en el período comprendido entre julio de 2011 a diciembre de 2012.

**Sujetos:** Para ser incluidos debían ser mayores de 65 años de edad y presentar al menos 3 de 5 criterios de síndrome metabólico según el Joint Interim Statement 2009.

Se excluyeron los pacientes que recibieron tratamiento corticoideo en los seis meses previos, aquellos con enfermedad oncológica no controlada,

pacientes bajo insulino terapia o individuos que no tuvieran capacidad de comprender y/o firmar el consentimiento informado.

Se incluyeron 88 pacientes, de los cuales 68 % fueron mujeres (n = 60) y 32 % hombres (n = 28). La edad media de la población fue 73 ± 6 años en mujeres y 74 ± 6 años en hombres.

**Métodos:** Los pacientes concurren con doce horas de ayuno entre las 8 y 8.30 h y se les extrajo una muestra de sangre venosa que fue separada en un tubo con Heparina de Li y otro tubo seco. Los tubos fueron centrifugados obteniéndose dos muestras de suero para el posterior dosaje de osteocalcina e insulina. El resto de las determinaciones fueron procesadas en el día.

Los parámetros metabólicos estudiados fueron: 1) Glucemia (ensayo enzimático colorimétrico, Cobas 311, Roche®; VR 70-110 mg/dl). 2) HbA1c (ensayo inmunoturbidimétrico, Cobas 311, Roche®; VR 4,8-5,9 %). 3) Insulina (quimioluminiscencia, IMMULITE1000, Siemens®; VR hasta 17 μUI/ml) (CV 4,9 %). 4) TG (ensayo enzimático colorimétrico; VR 40-150 mg/dl) (CV 2,0 %). 5) HDL (ensayo homogéneo colorimétrico; VR: hombres con bajo riesgo cardiovascular (RCV) > 55, moderado RCV 35-55, alto RCV < 35; mujeres con bajo RCV > 65, moderado RCV 45-65, alto RCV < 45 mg/dl) (CV 2,5 %). 6) Colesterol total (ensayo enzimático colorimétrico; VR normal < 200, límite 200-239, alto > 239 mg/dl) (CV 2,5 %). 7) LDL calculado por fórmula de Friedwald o ensayo homogéneo, Cobas 311, Roche®; VR normal < 100, límite 100-129, intermedio 130-159, alto > 160 mg/dl) (CV 2,0 %). 8) Osteocalcina (quimioluminiscencia, IMMULITE1000, Siemens®; VR: hasta 21 ng/ml) (CV 7,9 %).

La insulinoresistencia fue definida por tres índices diferentes: 1) HOMA (insulina basal (μUI/ml) x glucosa sérica en ayunas (mmol/l)) / 22,5 (VR < 2,5)<sup>(8)</sup>, 2) TG/HDL (VR < 3)<sup>(15)</sup> y 3) QUICKI (1/(log insulina sérica + log glucosa sérica); VR: 0,67-0,74 para la población general y 0,41-0,52 para pacientes diabéticos)<sup>(16)</sup>.

## RESULTADOS

### Examen físico

El índice de masa corporal medio fue 31,3 ± 4,7 en hombres, 33,1 ± 5,7 en mujeres y el perímetro de cintura medio 105 ± 11 cm en ambos sexos. La tensión arterial sistólica y diastólica media fueron 136 ± 14 mmHg y 79 ± 8 mmHg respectivamen-

te en hombres, siendo  $135 \pm 13$  mmHg y  $78 \pm 8$  mmHg en mujeres (Tabla I).

### Parámetros de laboratorio

Se obtuvieron los siguientes valores promedio en hombres y mujeres respectivamente: glucemia  $134 \pm 34$  mg/dl y  $128 \pm 45$  mg/dl, HOMA  $3,87 \pm 3,44$  y  $3,87 \pm 3,31$ , QUICKI  $0,33 \pm 0,04$  y  $0,35 \pm 0,05$ , TG  $155 \pm 91$  mg/dl y  $171 \pm 97$  mg/dL, HDL  $41 \pm 8$  mg/dL y  $50 \pm 14$  mg/dl, colesterol total  $167 \pm 32$  mg/dL y  $203 \pm 20$  mg/dl, LDL  $102 \pm 27$  mg/dL y  $127 \pm 41$  mg/dl, HbA1c  $7,6 \pm 1,8$  % y  $7 \pm 1,5$  %, osteocalcina  $3,1 \pm 2,9$  ng/ml y  $3,7 \pm 2,8$  ng/ml, insulinemia  $12,1 \pm 10,6$  mUI/ml y  $12,3 \pm 23,4$  mUI/ml (Tabla I).

Los niveles de osteocalcina sérica correlacionaron positivamente con HDL ( $r = 0,213$ ,  $p = 0,05$ ) y QUICKI ( $r = 0,212$ ,  $p = 0,05$ ) e inversamente con TG ( $r = -0,218$ ,  $p < 0,05$ ), índice TG/HDL ( $r = -0,217$ ,  $p < 0,05$ ) y HbA1c ( $r = -0,253$ ,  $p < 0,05$ ) (Tabla II).

### DISCUSIÓN

La evidencia creciente de la relación entre metabolismo energético y hueso ha impulsado este estudio de osteocalcina, insulinorresistencia, insulinosensibilidad y síndrome metabólico en adultos mayores. En el presente trabajo pudimos comprobar una asociación negativa entre los niveles de osteocalcina y TG, índice TG/HDL y HbA1c, marcadores

de compromiso metabólico e insulinorresistencia y una correlación positiva entre HDL y QUICKI, marcadores de insulinosensibilidad. Por otra parte, también verificamos una correlación positiva entre LDL y tensión arterial sistólica. Numerosos trabajos clínicos mostraron en diferentes cohortes una asociación entre los niveles séricos de osteocalcina y diversos parámetros de salud metabólica.

Como fue expuesto previamente, el índice HOMA es uno de los marcadores de insulinorresistencia más utilizados y para su evaluación se deben determinar los niveles basales de glucemia e insulinemia. Dado que esta última varía significativamente, es difícil establecer valores de corte ideales de dicho índice<sup>(9)</sup>. Por otra parte el QUICKI, marcador de insulinosensibilidad, presenta buena correlación con el clamp euglicémico hiperinsulinémico y tiene la ventaja de predecir el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2<sup>(10)</sup>.

El índice TG/HDL es de mayor utilidad como marcador de insulinorresistencia y tiene la ventaja de ser metodológicamente sencillo y económico<sup>(11)</sup>. La medición plasmática de los lípidos se encuentra estandarizada en un grado mucho mayor que el dosaje de la concentración plasmática de insulina, por lo cual la posibilidad de obtener un valor numérico específico de utilidad clínica es mucho mayor para el caso del índice TG/HDL<sup>(9)</sup>. Además, los adultos mayores presentan una disminución de la efectividad de la acción de la insulina debido a un aumento de la grasa abdominal, disminución

TABLA 1. Características de la población

	Hombres		Mujeres	
	32% Promedio	n = 28 (± DS)	68% Promedio	n = 60 (± DS)
Edad (años)	74	(± 6,97)	73	(± 6)
IMC	31,3	(± 4,7)	33,1	(± 5,7)
Perímetro de cintura (cm)	105	(± 11)	105	(± 11)
Glucemia (mg/dl)	134	(± 34)	128	(± 45)
HOMA	3,87	(± 3,44)	3,87	(± 7,31)
QUICKI	0,33	(± 0,04)	0,35	(± 0,05)
Tensión arterial Sistólica (mmHg)	136	(± 14)	135	(± 13)
Tensión arterial Diastólica (mmHg)	76	(± 8)	78	(± 8)
TG (mg/dl)	155	(± 91)	171	(± 97)
HDL (mg/dl)	41	(± 8)	50	(± 14)
Colesterol total (mg/dl)	167	(± 32)	203	(± 50)
LDL (mg/dl)	102	(± 27)	127	(± 41)
HbA1c (%)	7,6	(± 1,8)	7,0	(± 1,5)
Osteocalcina (ng/ml)	3,1	(± 2,9)	3,7	(± 2,8)
Insulinemia (μUI/ml)	12,1	(± 10,6)	12,3	(± 23,4)

**TABLA 2.** Correlación entre osteocalcina y los diferentes parámetros metabólicos

	r	P
IMC	0,04	0,68
Perímetro de cintura (cm)	0,38	0,38
Glucemia (mg/dl)	-0,15	0,15
Insulina ( $\mu$ UI/ml)	-0,02	0,80
Tensión arterial Sistólica (mmHg)	0,22	0,04
Tensión arterial Diastólica (mmHg)	-0,17	0,123
TG (mg/dl)	-0,21	0,04
TG/HDL-colesterol	-0,21	0,04
HbA1c (%)	-0,25	0,01
Colesterol total (mg/dl)	0,18	0,09
LDL (mg/dl)	0,22	0,04
HDL (mg/dl)	0,21	0,05
QUICKI	0,21	0,05

de la actividad física, sarcopenia, disfunción mitocondrial y aumento del estrés oxidativo, por lo cual este índice sería un marcador de insulinoresistencia independiente de edad y sexo<sup>(17)</sup>. Por lo expuesto fueron tomados en consideración HDL, QUICKI y el índice TG/HDL para el análisis de las condiciones de insulinosensibilidad e insulinoresistencia respectivamente, en el presente trabajo.

Se ha demostrado que la osteocalcina podría favorecer el metabolismo de los hidratos de carbono incrementando la secreción de insulina en hombres y en mujeres adultos diabéticos tipo 2, mejorando no solo la secreción sino también la insulinosensibilidad, esto último verificado en nuestro grupo de pacientes<sup>(18)</sup>. El estudio MINOS mostró que los niveles de osteocalcina correlacionaron de manera inversa con el número de criterios de síndrome metabólico en hombres añosos<sup>(19)</sup>. Hwang y col. publicaron que los niveles de osteocalcina están asociados inversamente al desarrollo de diabetes 2 independientemente de los niveles circulantes de adiponectina y leptina<sup>(20)</sup>. El mismo grupo mostró recientemente la asociación entre los niveles circulantes de osteocalcina y el desarrollo de enfermedad cardiovascular en hombres de edad media. En coincidencia con nuestros resultados se observó una correlación negativa con TG, HbA1c y LDL, además de verificar una asociación con IMC, porcentaje de grasa corporal, glucemia en ayunas y HOMA que no pudimos comprobar en nuestra cohorte. También demostraron una correlación positiva con HDL al igual que nuestro estudio, pero no encontraron correlación positiva entre los valores de tensión arterial y osteocalcina,

resultado que fue corroborado en nuestra cohorte de pacientes<sup>(21)</sup>. Otro grupo demostró disminución del riesgo de enfermedad cardiovascular asociada a niveles más altos de osteocalcina en individuos mayores de 76 años, mientras que dicho efecto no se verificó en individuos más jóvenes, no siendo mediado por calcificación arterial ni por factores de riesgo metabólicos. Estos resultados sugieren diferencias del efecto de la osteocalcina sobre el riesgo cardiometabólico, relacionados con la edad de los individuos<sup>(22)</sup>. Nosotros no evaluamos eventos cardiovasculares en nuestra población, dato que queda pendiente para próximos estudios.

Como fue previamente mencionado, estudios básicos “in vitro” e “in vivo” mostraron que la osteocalcina promovía un aumento de la expresión y secreción de insulina, así como un aumento de la masa de células beta pancreáticas y una disminución de la expresión y secreción de adiponectina por los adipocitos. Los animales que presentaban una falta de osteocalcina mostraron una disminución en la sensibilidad a la insulina en músculo, hígado y tejido adiposo y una disminución del gasto energético<sup>(3,4)</sup>. Se comprobó recientemente que la acción metabólica de la osteocalcina es mediada por su interacción con un receptor específico, el GPRC6A<sup>(23)</sup>. Se verificó en animales de experimentación que la osteocalcina estimula la proliferación de las células beta tanto en el período perinatal como en animales adultos a través de su interacción con el receptor GPRC6A dependiendo de ciclina D1<sup>(24)</sup>. Recientemente, se avanzó en el conocimiento del funcionamiento de la vía metabólica responsable de la expresión de la adiponectina estimulada por la osteocalcina. Esta involucra la interacción con el mencionado receptor, activando AMPc y PKA así como fosforilando CREB, el cual estimula la expresión de PPAR $\gamma$  que favorece la expresión de adiponectina en adipocitos<sup>(25)</sup>.

## CONCLUSIONES

Nuestro trabajo presenta por primera vez datos de una cohorte argentina de adultos mayores, donde se verifica una correlación negativa de la osteocalcina con parámetros de insulinoresistencia y positiva con los de insulinosensibilidad avalando de esta manera la hipótesis sugerida por las observaciones en animales de experimentación donde se comprobó la actividad de una proteína ósea como la osteocalcina sobre la regulación del metabolismo energético.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR.** Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: Results of a 25-year follow-up. *Lancet* 340:925-929, 1992
2. **Després JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien PJ.** Hiperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med.* 11:952- 957, 1996
3. **Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G.** Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-452, 1996
4. **Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G.** Extracellular matrix mineralization is regulated locally, different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 165:625-630, 2004
5. **Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G.** Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456-459, 2007
6. **Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, De Pinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G.** Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142:296-308, 2010
7. **Zhou M, Ma X, Li H, Pan X, Tang J, Gao Y, Hou X, Lu H, Bao Y, Jia W.** Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in Chinese individuals. *Eur J Endocrinol.* 161:723-729, 2009
8. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC.** Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419, 1985
9. **McLaughlin T, Reaven G, Abbasi F, Lamendola C, Saad M, Waters D, Simon J, Krauss RM.** Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *Am J Cardiol.* 96:399-404, 2005
10. **Geloneze B, Tambascia M.** Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 50:208-215, 2006
11. **Salazar MR, Carbajal HA, Espeche WG, Leiva Sisniegues CE, Balbín E, Dulbecco CA, Aizpurúa M, Marillet AG, Reaven GM.** Relation among the plasma triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol concentration ratio, insulin resistance, and associated cardio-metabolic risk factors in men and women. *Am J Cardiol.* 109:1749-1753, 2012
12. **Hwang Yc, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY.** The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle aged male subjects. *Diab Metab Res Rev.* 25:768-772, 2009
13. **Shea MK, Gundberg CM, Meigs JB.** Gamma-carboxylation of osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:827-832, 2009.
14. **Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T.** Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:45-49, 2009
15. **Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellström D.** Plasma osteocalcin is inverse related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res.* 24:785-791, 2008
16. **Yokoyama H, Emoto M, Fujiwara S, Motoyama K, Morioka T, Komatsu M, Tahara H, Shoji T, Okuno Y, Nishizawa Y.** Quantitative insulin sensitivity check index and the reciprocal index of homeostasis model assessment in normal range weight and moderately obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 26:2426-2432, 2003
17. **Kalyani RR, Egan JM.** Diabetes and Altered Glucose Metabolism with Age. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 42:333-347, 2013
18. **Rui X, Xu B, Su J, Pan C, Zhan C, Su B, Li H, Wang J, Sheng H, Qu S.** Differential pattern for regulating insulin secretion, insulin resistance, and lipid metabolism by osteocalcin in male and female T2DM patients. *Med Sci Monit.* 20:711-719, 2014
19. **Confavreux CB, Szulc P, Casey R, Varennes A, Goudable J, Chapurlat RD.** Lower serum osteocalcin is associated with more severe metabolic syndrome in elderly men from the MINOS cohort. *Eur J Endocrinol.* 171:275-283, 2014
20. **Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY.** Circulating osteocalcin level is associated with improved glucose tolerance, insulin secretion and sensitivity independent of the plasma adiponectin level. *Osteoporos Int.* 23:1337-1342, 2012
21. **Hwang YC, Kang M, Cho IJ, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY, Lee MK.** Association between the Circulating Total Osteocalcin Level and the Development of Cardiovascular Disease in Middle-aged Men: A Mean 8.7-year Longitudinal Follow-up Study. *J Atheroscler Thromb.* Epub ahead of print, 2014
22. **Holvik K, Schoor NM, Eekhoff EM, Heijer M, Deeg DJ, Lips P, Jongh R.** Plasma osteocalcin levels as a predictor of cardiovascular disease in older men and women: a population-based cohort study. *Eur J Endocrinol.* 171:161-170, 2014
23. **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.* 171:1129-1141, 2014
24. **Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P.** Osteocalcin promotes  $\beta$ -cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes* 63:1021-1031, 2014
25. **Otani T, Mizokami A, Hayashi Y, Gao J, Mori Y, Nakamura S, Takeuchi H, Hirata M.** Signalling pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin. *Cell Signal.* doi:10.1016/j. cellsig, 2014