



ORIGINAL

Efecto de diferentes dosis de propranolol sobre la eficiencia estructural y mecánica esquelética en un modelo animal de retraso del crecimiento

Christian Esteban Lezón, Patricia Mabel Pintos, María Itatí Olivera, Clarisa Bozzini y Patricia Mónica Boyer*

Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 7 de abril de 2011; aceptado el 19 de septiembre de 2011

Disponible en Internet el 16 de noviembre de 2011

PALABRAS CLAVE

Retraso del crecimiento;
Propranolol;
Calidad ósea;
Competencia biomecánica

Resumen

Objetivo: Evaluar en un modelo de retraso del crecimiento (enanismo por desnutrición [ED]) el efecto de diferentes dosis de propranolol (P) sobre las variables antropomorfo-métricas y biomecánicas del esqueleto apendicular.

Materiales y métodos: Ratas macho Wistar de 21 días se dividieron en grupos: control (C), C + P3,5 (CP3,5); C + P7 (CP7); C + P10,5 (CP10,5); C + P14 (CP14); ED, ED + P3,5 (EDP3,5); ED + P7 (EDP7); ED + P10,5 (EDP10,5) y ED + P14 (EDP14). Los animales controles con/sin P recibieron una dieta para roedores *ad libitum*; las ratas ED con/sin P recibieron por cada 100 g de peso corporal un 80% de la misma dieta durante 4 semanas (T4). Propranolol 3,5; 7; 10,5 y 14 mg/kg/día fue inyectado intraperitonealmente 5 días/semana durante 4 semanas en CP3,5 y EDP3,5; CP7 y EDP7; CP10,5 y EDP10,5 y CP14 y EDP14, respectivamente.

Resultados: A T4, la restricción energética produjo efectos negativos sobre el crecimiento global, el fémur y su competencia mecánica. Propranolol mejoró la rigidez ósea en los animales ED con dosis de 7 y 10,5 mg/kg/día, con un máximo de respuesta a 7 mg/kg/día.

Conclusiones: El propranolol 7 mg/kg/día sería la dosis más efectiva en la incorporación modelatoria de hueso con incremento de su eficiencia estructural y mecánica en el presente modelo animal de retraso del crecimiento. Dicho efecto podría ser el resultado del mantenimiento de la viabilidad del mecanosensor, de modificaciones de su sensibilidad, del punto de referencia biomecánico y/o de la respuesta de los efectores en las ratas ED.

© 2011 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pboyer59@hotmail.com (P.M. Boyer).

KEYWORDS

Growth retardation;
 Propranolol;
 Bone quality;
 Biomechanical
 competence

Effect of different propranolol doses on skeletal structural and mechanic efficiency in an animal model of growth retardation

Abstract

Objective: To assess in a growth retardation (GR) model the impact of different propranolol (P) doses on anthropomorphic and biomechanical variables of the appendicular skeleton.

Materials and methods: Twenty-one day-old male Wistar rats were divided into the following groups: control (C), C+P3.5 (CP3.5); C+P7 (CP7); C+P10.5 (CP10.5); C+P14 (CP14); ED, ED+P3.5 (EDP3.5); ED+P7 (EDP7); ED+P10.5 (EDP10.5), and ED+P14 (EDP14). Control animals with/without P were fed a rodent diet *ad libitum*. GR rats with/without P were given 80% of the same diet per 100 g body weight for 4 weeks (T4). Propranolol 3.5, 7, 10.5, and 14 mg/kg/day was intraperitoneally injected 5 days/week for 4 weeks to the CP3.5 and EDP3.5; CP7 and EDP7; CP10.5 and EDP10.5, and CP14 and EDP14 groups respectively.

Results: At T4, energy restriction had negative effects upon overall growth, femur, and its mechanical competence. Propranolol improved bone rigidity in GR animals at doses of 7 and 10.5 mg/kg/day, with a maximum response at 7 mg/kg/day.

Conclusions: Propranolol 7 mg/kg/day would be the most effective dose for modeling incorporation of bone, as shown by the increased skeletal structural and mechanic efficiency in this animal model of growth retardation. Such effect may result from maintenance of mechanosensor viability, changes in its sensitivity, the biomechanical reference point and/or effector response in GR rats.

© 2011 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La calidad del esqueleto axial y apendicular está determinada por numerosos factores, siendo la condición nutricional de gran importancia. La malnutrición calórico-proteica durante el desarrollo del individuo, principalmente durante los períodos críticos del crecimiento, contribuye al deterioro del mismo con el consiguiente riesgo de osteoporosis y fragilidad ósea en la edad avanzada¹⁻⁶. Si bien la osteoporosis, la afección más frecuente de remodelado óseo, se presenta con mayor frecuencia en la edad adulta, la calidad del hueso de un individuo está en relación directa con el pico de la masa ósea, el cual, a su vez, está influenciado por los factores endógenos y exógenos condicionantes del crecimiento y desarrollo^{7,8}.

Determinadas creencias y prácticas impuestas por los padres a sus hijos pueden restringir la nutrición del niño al punto de inducir una enfermedad de origen nutricional conocida como enanismo por desnutrición (ED). El ED se caracteriza por presentar una desaceleración en el crecimiento corporal con retraso en el desarrollo puberal, sin evidencia de fallo orgánico ni alteraciones en los marcadores bioquímicos de desnutrición⁹⁻¹².

En nuestro laboratorio hemos descrito un modelo de estrés nutricional en ratas en crecimiento, el cual recrea el ED humano, una forma de desnutrición manifestada como un déficit de los índices peso y talla para la edad con un índice peso para la talla dentro de límites normales. Este modelo animal de enanismo por desnutrición se logró por administración crónica de una dieta balanceada a ratas recién destetadas, la restricción global fue del 20% comparada con los requerimientos energéticos de animales de idéntica edad¹³.

Dado que el ED presenta alteraciones neuroendocrinas secundarias al estrés nutricional^{14,15}, la adquisición de hueso durante las etapas críticas del crecimiento puede verse

sensiblemente afectada. En efecto, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, hemos observado un deterioro del diseño arquitectónico con disminución de la aptitud mecánica para soportar fuerzas deformantes en el fémur de ratas con ED^{2,3,16,17}.

Estudios *in vivo* e *in vitro* evidenciaron la participación del sistema nervioso simpático (SNS) en la modulación del metabolismo óseo. Se demostró la existencia de inervación simpática esquelética, la presencia de fibras simpáticas en la médula ósea y el incremento de la osteoclastogénesis con aumento de la resorción y/o disminución de la formación ósea por incremento de la actividad del SNS¹⁸⁻²³. Asimismo, se evidenció la presencia de receptores β -adrenérgicos en las células óseas, de cuya activación resultó un incremento de la expresión de RANKL con aumento de la resorción ósea²⁴.

Sin embargo, estudios de simpatectomía química o quirúrgica arrojaron resultados controvertidos respecto del papel del SNS en el metabolismo óseo, sugiriendo que éste posee un efecto anabólico sobre el mismo^{25,26}.

Si bien es sabido que los β -bloqueantes son ampliamente utilizados en enfermedades cardiovasculares, numerosos hallazgos sugieren las probables implicaciones preventivas y/o terapéuticas de los mismos a través de un efecto protector de la masa ósea frente a diversas situaciones de estrés, tanto en humanos^{27,28} como en animales de experimentación^{29,30}. En efecto, se ha evidenciado en ratones macho adultos de la cepa C57BL/6 que la administración crónica de propranolol (P) previno la reducción del volumen óseo causada por la ingesta de una dieta restringida en un 40%, pero con compensación de calcio y fosfato³¹. Estudios realizados por Bonnet et al.³⁰ demostraron que bajas dosis de P mejoran la competencia biomecánica ósea de ratas ovariectomizadas sin modificaciones hemodinámicas.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó un aumento de la calidad ósea en ratas con ED

tratadas con P en forma crónica³². Sin embargo, existen algunas inconsistencias respecto del efecto de β -bloqueantes como el P sobre el incremento de la masa ósea y la disminución del riesgo de fractura a partir de datos obtenidos en otros estudios experimentales^{26,33} y clínicos^{34,35}, tanto en individuos jóvenes como adultos.

Debido a la relación existente entre la condición nutricional y la aptitud biomecánica del hueso, y a la evidencia de un control β -adrenérgico de la masa ósea, el objetivo del presente estudio fue evaluar en un modelo animal de retraso del crecimiento de origen nutricional, ED, el efecto de diferentes dosis del β -bloqueante P sobre las variables antropo-morfométricas y biomecánicas óseas. Asimismo, se determinó la dosis más adecuada que permita alcanzar la rigidez estructural apropiada como para soportar la estimulación mecánica habitual y/o máxima conservando la integridad del hueso.

Materiales y métodos

Animales de experimentación

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar desde el destete de 21-23 días de edad (peso inicial: $48,90 \text{ g} \pm 1,60$; media \pm ES) provistas por la Cátedra de Bioquímica General y Bucal de la Facultad de Odontología, UBA. Los animales fueron mantenidos en jaulas galvanizadas en condiciones higiénicas apropiadas para evitar la coprofagia. Se respetaron los ciclos 12:12 horas de luz-oscuridad. La temperatura ambiental se mantuvo a 21 ± 1 °C, con una humedad relativa del 50-60%. El uso, cuidado y tratamiento de los animales experimentales se realizó de acuerdo con los normas del «*National Institutes of Health*»³⁶ y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires.

Dieta

Los animales de experimentación se alimentaron con una dieta especial (Purina en pellets) para roedores con la siguiente composición centesimal (g/100g de dieta): proteína: 22,70; lípidos: 7,09; fibra: 6,00; Ca: 1,30; P: 0,80; cenizas: 6,50; agua: 7,60; dextrina csp 100.

Diseño experimental

Ochenta ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 10 grupos de 8 animales cada uno según hayan recibido vehículo o P (P; Laboratorios Richmond, Argentina) en dosis de 3,5 (P3,5); 7 (P7); 10,5 (P10,5) y 14 (P14) mg/kg/día: control + vehículo (C); control + P3,5 (CP3,5); control + P7 (CP7); control + P10,5 (CP10,5); control + P14 (CP14); experimentales ED + vehículo (ED); experimentales ED + P3,5 (EDP3,5); experimentales ED + P7 (EDP7); experimentales ED + P10,5 (EDP10,5) y experimentales ED + P14 (EDP14). Propranolol fue inyectado intraperitonealmente 5 días por semana durante 4 semanas en las dosis mencionadas. El grupo control y ED recibieron solución salina con idéntico régimen. El grupo control con/sin P fueron alimentados con una dieta estándar en condiciones de libre demanda; ED con/sin P

recibieron un 80% de la dieta consumida por C el día previo corregido por el peso corporal (consumo en g/100 g peso corporal/día), durante 4 semanas. Se realizó el registro diario de la ingesta de alimento, y cada 2 y 4 días, el del peso y de la longitud corporales, respectivamente. Los animales fueron sacrificados por inyección intramuscular de hidrocloruro de ketamina: 0,1 mL/100 g de peso corporal, Holliday Lab. y xilazina: 0,02 mL, König Lab. Buenos Aires, Argentina, a las 4 semanas experimentales (T4). Inmediatamente, los fémures de cada animal fueron disecados evitando lesionar el periostio. Ambos huesos fueron pesados y medidos con un calibre digital y empleados para el estudio de las propiedades biomecánicas óseas.

Evaluación del crecimiento

Antropometría

Se midieron el peso (p) y la longitud (l) corporales. Para el registro del peso se utilizó una balanza Mettler PC 4000 con una precisión de ± 1 mg, con una frecuencia de medición de 4 días, guardando un ayuno mínimo de dos horas y máximo de 4 horas, previo a la determinación. La longitud corporal fue registrada en función de la distancia entre el hocico y los pelos de la base de la cola.

Ingesta dietética

La ingesta de dieta se midió diariamente con una balanza Mettler con una precisión de ± 1 mg. La medida de consumo se determinó por la diferencia de peso del comedero de dos días consecutivos. Este se expresó en 100 g de rata/día.

Evaluación de la morfometría de fémur

Se realizó la ablación de los huesos y se los liberó de tejido muscular y tendinoso. Se los pesó y se registró su longitud mediante un calibre micrométrico digital con una precisión de 0,05 mm.

Evaluación de las propiedades biomecánicas de la diáfisis femoral

Se evaluó la calidad mecánica de los huesos mediante un ensayo mecánico de flexión a tres puntos en un equipo Instron modelo 4442³⁷. El fémur fue colocado en posición horizontal, con la cara anterior mirando hacia abajo sobre dos soportes equidistantes de sus extremos, separados por una distancia constante de 13 mm. La diáfisis fue cargada centralmente a una tasa creciente, a razón de 50 N a una velocidad de 5 mm/min hasta la fractura. Las curvas carga/deformación (W/d) obtenidas permitieron determinar las siguientes variables representativas de las propiedades estructurales del hueso entero: carga de fractura (Wf, N), carga elástica máxima límite (Wy, N) y rigidez ósea (Wy/dy, N/mm), donde dy representa la deformación del hueso en el sector de comportamiento elástico. Se efectuaron cortes a nivel de la media diáfisis femoral utilizando una microsierra de punta de diamante Isomet (Buehler, Lake Bluff, IL, EE.UU.), y se calcularon los diámetros horizontales y verticales externos e internos de la sección transversal para la evaluación de las propiedades geométricas óseas:

área ósea total de sección transversa (CSA, mm²), estimada mediante la fórmula: $\pi/4.V.H$, momento de inercia axial (I_x , mm⁴), estimado mediante la fórmula: $I_x = \pi (V^3H - v^3h)/64$ y área medular (MA, mm²), estimada como $MA = \pi/4.v.h$, donde H y V corresponden a los diámetros externos horizontal y vertical respectivamente, y h y v corresponden a los diámetros internos horizontal y vertical respectivamente de la sección transversal del hueso a nivel de la media diáfisis. El área ósea cortical de la sección transversa (A, mm²) se calculó por la diferencia entre CSA y MA.

Mediante la homologación del fémur con un cilindro elíptico y la aplicación de fórmulas matemáticas se calcularon indirectamente las siguientes propiedades materiales del hueso cortical: módulo elástico de Young (E, N/mm²), estimado por la fórmula: $E = Wy.L^3/48 dy.I_x$, donde Wy = carga elástica límite, L = longitud del hueso, dy = deformación en el punto de cesión, I_x = momento de inercia axial; y estrés elástico máximo (σ_y , N/mm²), estimado mediante la fórmula: $\sigma_y = L.V.Wy/8.I_x$, donde V es el diámetro externo vertical.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm ES. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA). Con posterioridad se empleó el test de la t de Student-Newman-Keuls de comparaciones múltiples. Las diferencias entre medias fueron consideradas significativas con un $p < 0,05$ ³⁸. El análisis estadístico se realizó mediante el programa computarizado Graphpad Prism version 3.0 (Graphpad Software, San Diego, California).

Resultados

En las figuras 1 y 2 se muestran los perfiles de peso y de longitud corporales de ratas controles y experimentales con/sin P en función del tiempo, respectivamente. La restricción energética indujo una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) de la velocidad de crecimiento en los animales experimentales respecto de los controles, y ésta fue independiente de la administración de P para cualquiera de las dosis empleadas.

En la tabla 1 se presenta la morfometría del fémur de los animales controles y experimentales con/sin P a T4. El crecimiento del fémur fue afectado negativamente en las ratas subalimentadas comparado con sus respectivos controles ($p < 0,001$). Sin embargo, el tratamiento con P no produjo cambios evidentes en los parámetros morfométricos evaluados en ninguna de las dosis empleadas e independientemente de la condición nutricional.

En la tabla 2 se presentan las propiedades biomecánicas de la diáfisis femoral de los animales ED vs C. En congruencia con estudios previos realizados en nuestro laboratorio², los resultados biomecánicos del fémur muestran que las propiedades estructurales (carga máxima de fractura, carga en el límite elástico y rigidez ósea) de la media diáfisis se afectaron negativamente tras 4 semanas de restricción de alimento en las ratas ED respecto de los animales C ($p < 0,01$). Sin embargo, la capacidad resistiva del esqueleto apendicular de los animales ED posterior al estrés nutricional fue la adecuada para el tamaño corporal alcanzado, la que fue

Tabla 1 Peso y longitud femoral a tiempo final (T4)

	C	ED	CP3,5	EDP3,5	CP7	EDP7	CP10,5	EDP10,5	CP14	EDP14
Peso femoral (g)	0,648 \pm 0,023 ^a	0,440 \pm 0,015 ^b	0,655 \pm 0,034 ^a	0,455 \pm 0,015 ^b	0,630 \pm 0,020 ^a	0,480 \pm 0,020 ^b	0,660 \pm 0,050 ^a	0,410 \pm 0,030 ^b	0,690 \pm 0,050 ^a	0,535 \pm 0,040 ^b
Longitud femoral (mm)	27,05 \pm 0,16 ^a	23,76 \pm 0,12 ^b	26,77 \pm 0,32 ^a	24,18 \pm 0,28 ^b	27,43 \pm 0,38 ^a	25,10 \pm 0,20 ^b	27,60 \pm 0,44 ^a	23,57 \pm 0,64 ^b	28,36 \pm 0,27 ^a	26,28 \pm 0,90 ^b

Animales control (C), control + propranolol 3,5 mg/kg/día (CP3,5); control + propranolol 7 mg/kg/día (CP7); control + propranolol 10,5 mg/kg/día (CP10,5); control + propranolol 14 mg/kg/día (CP14). Experimentales ED (ED); experimentales ED + propranolol 3,5 mg/kg/día (EDP3,5); experimentales ED + propranolol 7 mg/kg/día (EDP7); experimentales ED + propranolol 10,5 mg/kg/día (EDP10,5); experimentales ED + propranolol 14 mg/kg/día (EDP14). Valor promedio \pm error estándar de 8 animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

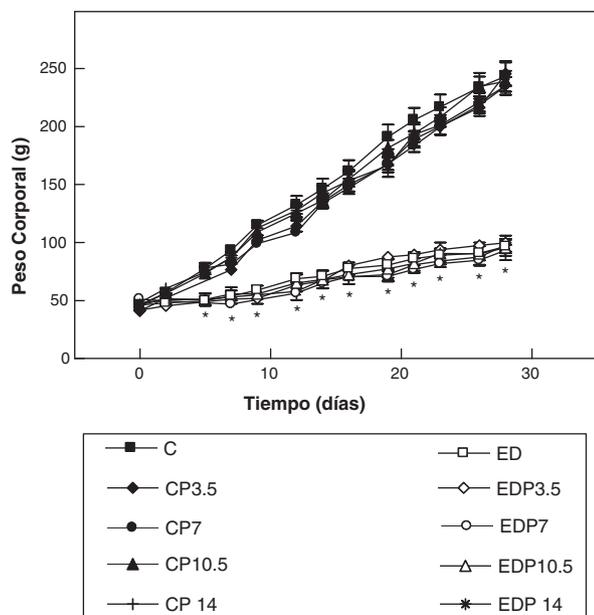


Figura 1 Evolución del peso corporal de los animales control (C), control + propranolol 3,5 mg/kg/día (CP3,5); control + propranolol 7 mg/kg/día (CP7); control + propranolol 10,5 mg/kg/día (CP10,5); control + propranolol 14 mg/kg/día; experimentales ED (ED), experimentales ED + propranolol 3,5 mg/kg/día (EDP3,5); experimentales ED + propranolol 7 mg/kg/día (EDP7); experimentales ED + propranolol 10,5 mg/kg/día (EDP10,5); experimentales ED + propranolol 14 mg/kg/día (EDP14) durante el período experimental. Valor promedio \pm error estándar de 8 animales por grupo. Diferencias significativas entre grupos ED respecto de C, con/sin propranolol ($p < 0,05$).

evidenciada mediante la normalización de la carga de fractura del fémur por el peso corporal. En efecto, Wf/p (N/g) de ED vs C fue de $0,091 \pm 0,02$ vs $0,097 \pm 0,01$ respectivamente ($p > 0,05$).

Al analizar el área total de la sección transversa y el momento de inercia axial, se observó que dichas variables geométricas fueron significativamente menores en el grupo ED respecto de las ratas C al final del período experimental ($p < 0,01$) (tabla 2). El área cortical de la sección transversa

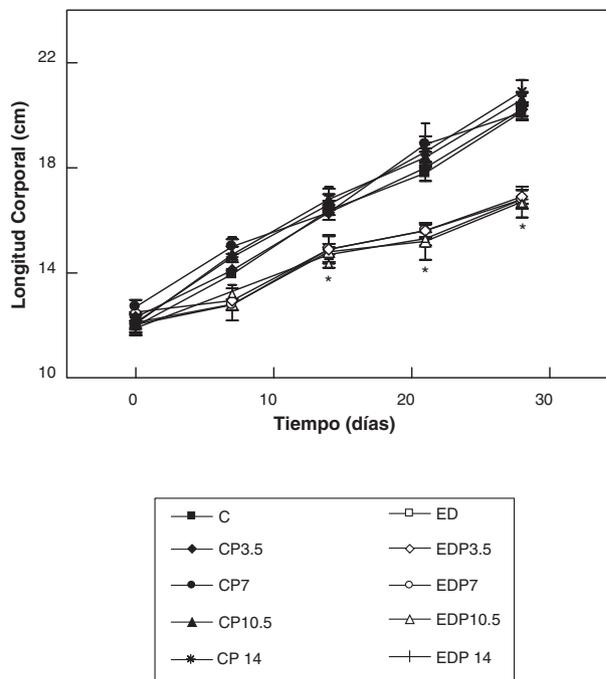


Figura 2 Evolución de la longitud corporal de los animales control (C), control + propranolol 3,5 mg/kg/día (CP3,5); control + propranolol 7 mg/kg/día (CP7); control + propranolol 10,5 mg/kg/día (CP10,5); control + propranolol 14 mg/kg/día; experimentales ED (ED), experimentales ED + propranolol 3,5 mg/kg/día (EDP3,5); experimentales ED + propranolol 7 mg/kg/día (EDP7); experimentales ED + propranolol 10,5 mg/kg/día (EDP10,5); experimentales ED + propranolol 14 mg/kg/día (EDP14) durante el período experimental. Valor promedio \pm error estándar de 8 animales por grupo. Diferencias significativas entre grupos ED respecto de C, con/sin propranolol ($p < 0,05$).

de la media diáfisis femoral fue significativamente menor en los ED vs C ($p < 0,01$). No se observaron diferencias significativas en el área de la sección transversa medular entre grupos ($p > 0,05$).

En lo que respecta a la calidad intrínseca del material óseo representada por las variables estrés elástico máximo

Tabla 2 Propiedades estructurales (carga de fractura, carga elástica máxima, rigidez ósea), geométricas (área total de sección transversa, área cortical de sección transversa, área medular de la sección transversa y momento de inercia) y materiales (estrés elástico máximo y módulo elástico) del fémur de animales control (C) y experimentales ED a tiempo final (T4)

	C	ED
Carga de fractura (N)	$51,40 \pm 2,88^a$	$25,20 \pm 3,24^b$
Carga elástica máxima (N)	$43,30 \pm 5,00^a$	$17,66 \pm 1,14^b$
Rigidez ósea (N/mm)	$123,66 \pm 10,87^a$	$47,31 \pm 9,80^b$
Área total de sección transversa (mm ²)	$12,81 \pm 0,76^a$	$8,95 \pm 0,14^b$
Área cortical de sección transversa (mm ²)	$7,07 \pm 0,44^a$	$4,98 \pm 0,30^b$
Área medular de sección transversa (mm ²)	$4,58 \pm 0,33^a$	$3,99 \pm 0,11^a$
Momento de inercia (mm ⁴)	$7,09 \pm 0,55^a$	$4,49 \pm 0,26^b$
Estrés elástico máximo (N/mm ²)	$27,25 \pm 2,37^a$	$26,13 \pm 4,31^a$
Módulo elástico (N/mm ²)	$506 \pm 64,4^a$	$352,0 \pm 157^a$

Valor promedio \pm error estándar de 8 animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

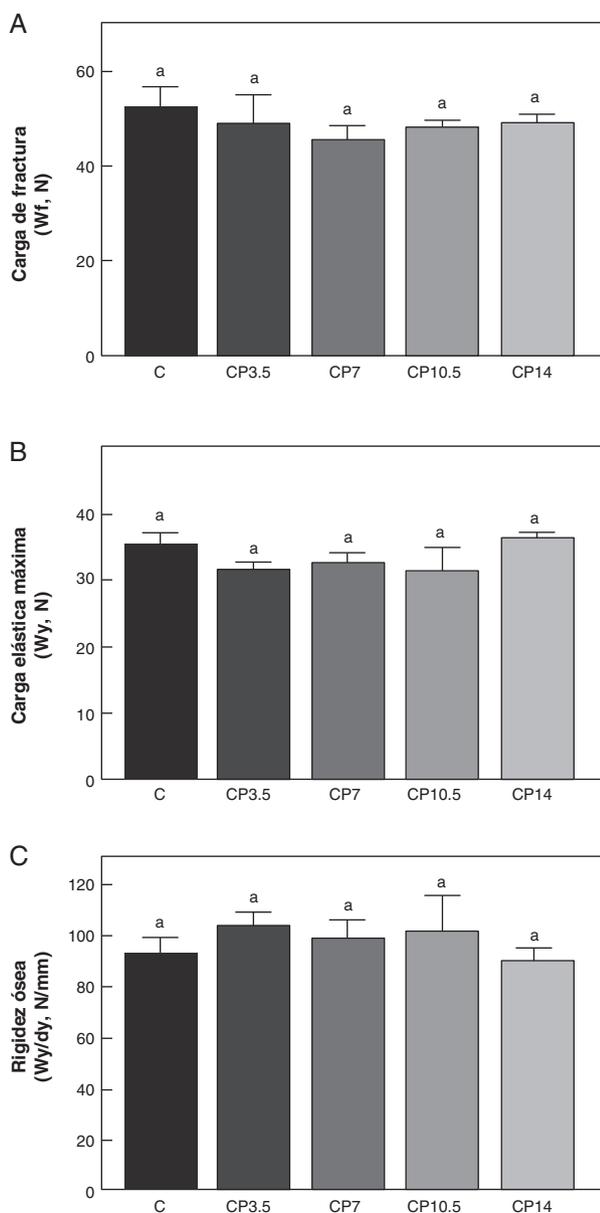


Figura 3 Propiedades estructurales. A: carga de fractura (Wf), B: carga elástica máxima (Wy) y C: rigidez ósea (Wy/dy), del fémur de animales control (C), control+propranolol 3,5 mg/kg/día (CP3,5); control+propranolol 7 mg/kg/día (CP7); control+propranolol 10,5 mg/kg/día (CP10,5); control+propranolol 14 mg/kg/día a tiempo final (T4). Valor promedio \pm error estándar de 8 animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

y módulo de elasticidad, no hubo diferencias significativas entre grupos a tiempo final ($p > 0,05$) (tabla 2).

En las figuras 3-5 se muestran las propiedades estructurales, geométricas y materiales, respectivamente, del fémur de animales controles con/sin P. Los resultados del presente trabajo evidencian que el β -bloqueante, en el régimen utilizado, no produjo efectos sobre la competencia biomecánica ósea en los animales alimentados a libre demanda

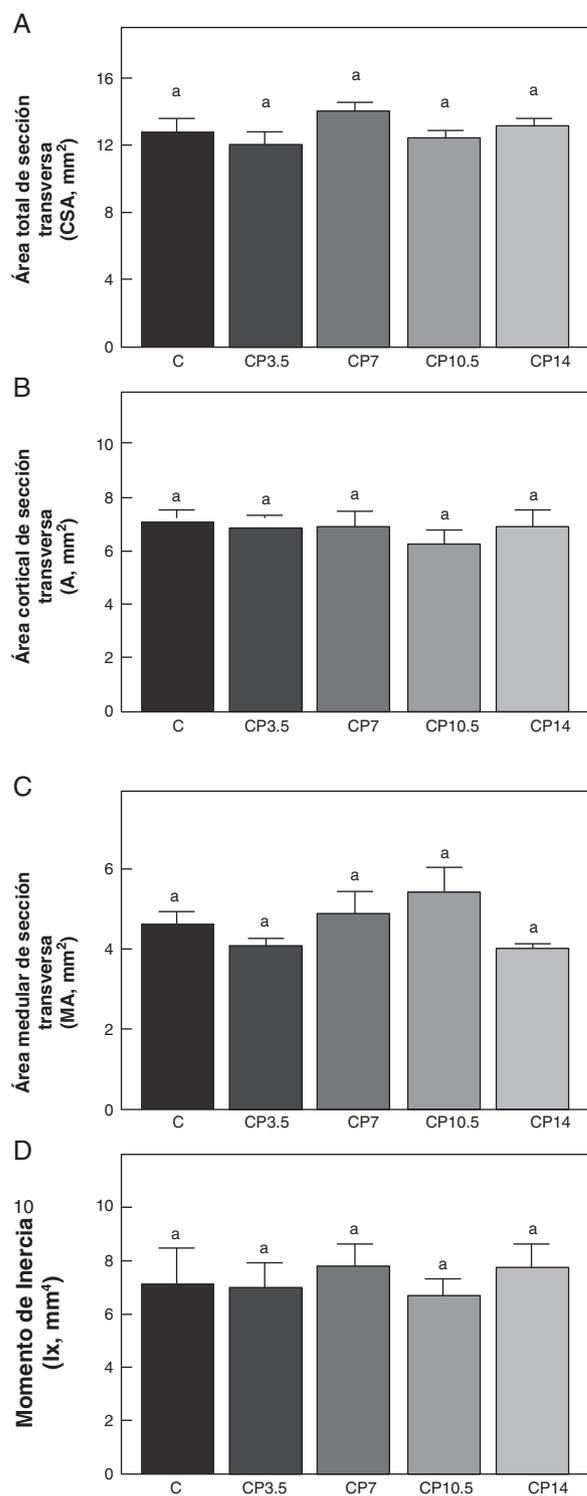


Figura 4 Propiedades geométricas. A: área total de sección transversa (CSA), B: área cortical de sección transversa (A), C: área medular de sección transversa (MA) y D: momento de inercia (Ix), del fémur de animales control (C), control + propranolol 3,5 mg/kg/día (CP3,5); control + propranolol 7 mg/kg/día (CP7); control + propranolol 10,5 mg/kg/día (CP10,5); control + propranolol 14 mg/kg/día a tiempo final (T4). Valor promedio \pm error estándar de 8 animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

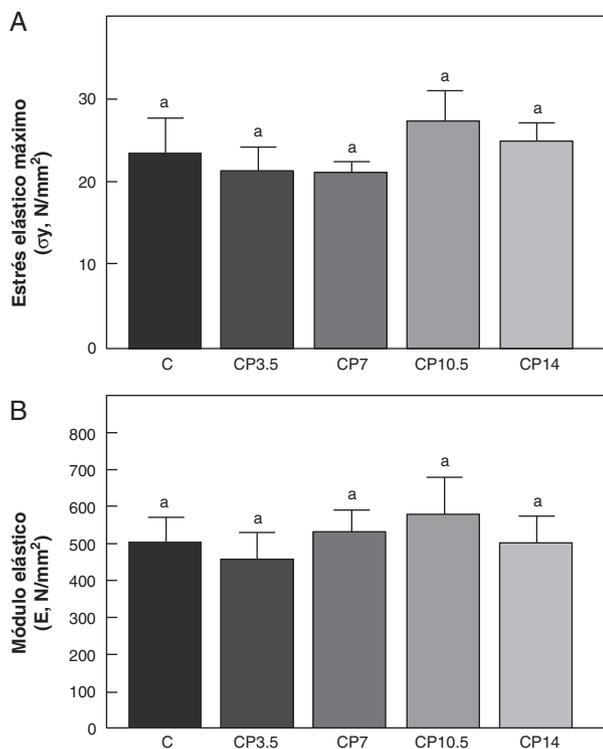


Figura 5 Propiedades materiales. A: estrés elástico máximo (σ_y) y B: módulo elástico (E), del fémur de animales control (C), control + propranolol 3,5 mg/kg/día (CP3,5); control + propranolol 7 mg/kg/día (CP7); control + propranolol 10,5 mg/kg/día (CP10,5); control + propranolol 14 mg/kg/día (CP14) a tiempo final (T4). Valor promedio \pm error estándar de 8 animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

tratados con P, entre sí ni respecto de los animales controles no tratados (figs. 3-5).

Al comparar la resistencia ósea a la fractura relativa al peso corporal se observó que no hubo diferencias significativas en Wf/p en ninguno de los grupos control tratados con P entre sí ni respecto de los animales controles no tratados. En efecto, Wf/p (N/g) de C; CP3,5; CP7; CP10,5 y CP14 fue de $0,097 \pm 0,01$; $0,103 \pm 0,01$; $0,096 \pm 0,03$; $0,094 \pm 0,01$ y de $0,097 \pm 0,01$, respectivamente ($p > 0,05$).

En las figuras 6-8 se muestran las propiedades estructurales, geométricas y materiales, respectivamente, del fémur de ratas ED tratadas con diferentes dosis de P expresadas como porcentaje de incremento de dichas variables respecto de las correspondientes a las ratas ED no tratadas. Los animales subalimentados tratados con P en dosis de 7 y 10,5 mg/kg/día presentaron aumentos significativos ($p < 0,05$) en las variables representativas de las propiedades estructurales del hueso entero como la carga de fractura, la carga elástica máxima límite y la rigidez ósea con respecto a las ratas ED no tratadas, con un máximo de incremento con 7 mg/kg/día (fig. 6). El P administrado a ratas ED en dosis de 3,5 y 14 mg/kg/día no produjo modificaciones significativas en ninguna de las variables biomecánicas evaluadas (fig. 6).

Al analizar la resistencia ósea a la fractura relativa al peso (Wf/p ; N/g) de los animales subalimentados tratados con P, ésta fue de $0,087 \pm 0,02$; $0,176 \pm 0,02$; $0,146 \pm 0,01$ y de $0,092 \pm 0,02$ para EDP3,5; EDP7; EDP10,5 y EDP14, respectivamente. Wf/p de EDP7 y EDP10,5 fue significativamente superior respecto de ED ($p < 0,05$). Si bien la capacidad resistiva a la fractura respecto del peso corporal de EDP7 fue superior a la de EDP10,5, no se evidenciaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$). No se observaron diferencias significativas en Wf/p de los grupos ED; EDP3,5; EDP14 ($p > 0,05$).

En relación a las propiedades geométricas óseas, los resultados del presente estudio muestran que los animales subalimentados tratados con 7 y 10,5 mg/kg/día de P,

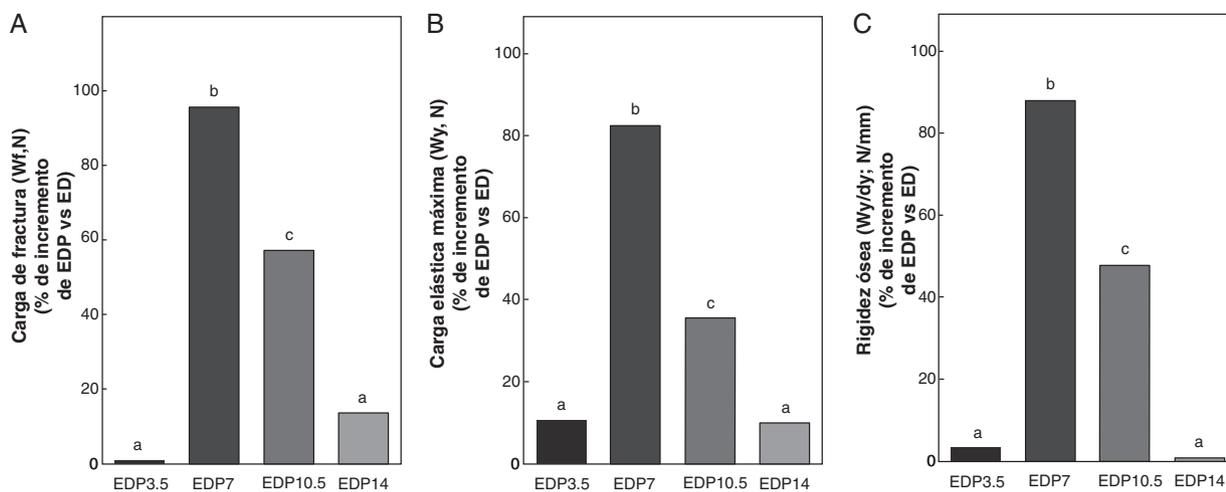


Figura 6 Propiedades estructurales. A: carga de fractura (Wf), B: carga elástica máxima (Wy) y C: rigidez ósea (Wy/dy), del fémur de animales experimentales ED + propranolol 3,5 mg/kg/día (EDP3,5); experimentales ED + propranolol 7 mg/kg/día (EDP7); experimentales ED + propranolol 10,5 mg/kg/día (EDP10,5); experimentales ED + propranolol 14 mg/kg/día (EDP14) expresadas como porcentaje de incremento de dichas variables respecto de las correspondientes a ED a tiempo final (T4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos, donde ED = a ($p < 0,05$).

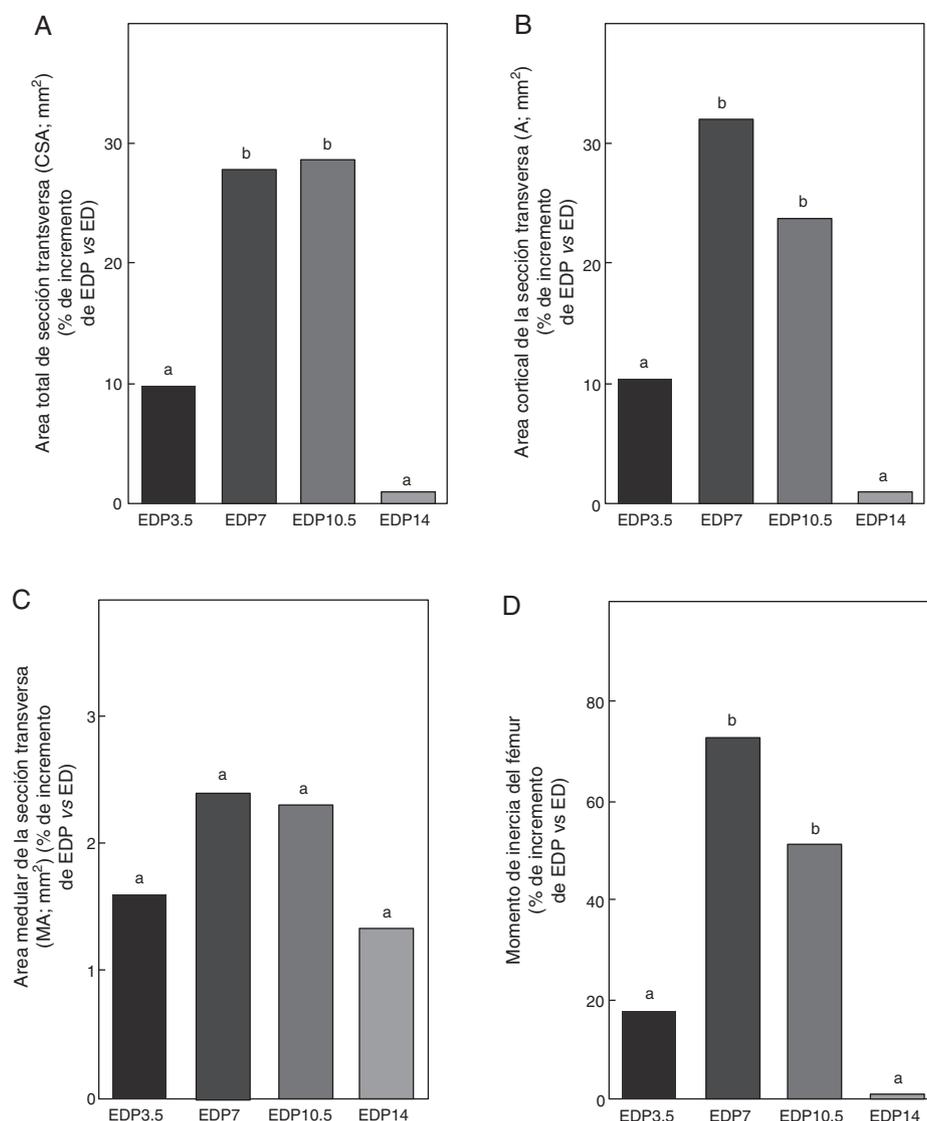


Figura 7 Propiedades geométricas. A: área total de sección transversa (CSA), B: área cortical de sección transversa (A), C: área medular de sección transversa (MA) y D: momento de inercia (I_x), del fémur de animales experimentales ED + propranolol 3,5 mg/kg/día (EDP3,5); experimentales ED + propranolol 7 mg/kg/día (EDP7); experimentales ED + propranolol 10,5 mg/kg/día (EDP10,5); experimentales ED + propranolol 14 mg/kg/día (EDP14) expresadas como porcentaje de incremento de dichas variables respecto de las correspondientes a ED a tiempo final (T4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos, donde ED = a ($p < 0,05$).

EDP7 y EDP10,5, respectivamente, presentan aumentos significativos en CSA, A e I_x respecto a ED ($p < 0,01$) (fig. 7). No se observan diferencias significativas entre las variables CSA, A e I_x de la media diáfisis femoral de EDP7 respecto de EDP10,5. El área medular no se afectó durante el tratamiento para ninguna de las dosis de P utilizadas ($p > 0,05$).

El P administrado a ratas ED en dosis de 3,5 y 14 mg/kg/día no produjo modificaciones en CSA, A, MA e I_x evaluadas ($p > 0,05$) (fig. 7).

En relación a la calidad intrínseca del material óseo, no hubo diferencias significativas en las variables estrés elástico máximo y módulo de elasticidad entre los animales subalimentados tratados con P entre sí ni respecto del grupo ED no tratado ($p > 0,05$) (fig. 8).

Discusión

De acuerdo con los conceptos modernos de la biología ósea, los esqueletos constituyen estructuras vivas siempre cambiantes en respuesta a distintos estímulos, entre ellos, mecánicos, farmacológicos, ambientales y nutricionales, siendo este último de gran incidencia en la calidad biomecánica ósea^{2,4-6,17}. En efecto, es el factor nutricional uno de los determinantes de la adquisición de hueso durante el crecimiento, el pico de masa ósea alcanzado en la edad adulta y la magnitud de la pérdida de hueso en la vejez.

Debido a la relación existente entre el desarrollo integral del individuo, el equilibrio salud-enfermedad, la condición nutricional y la aptitud biomecánica ósea, y a la evidencia

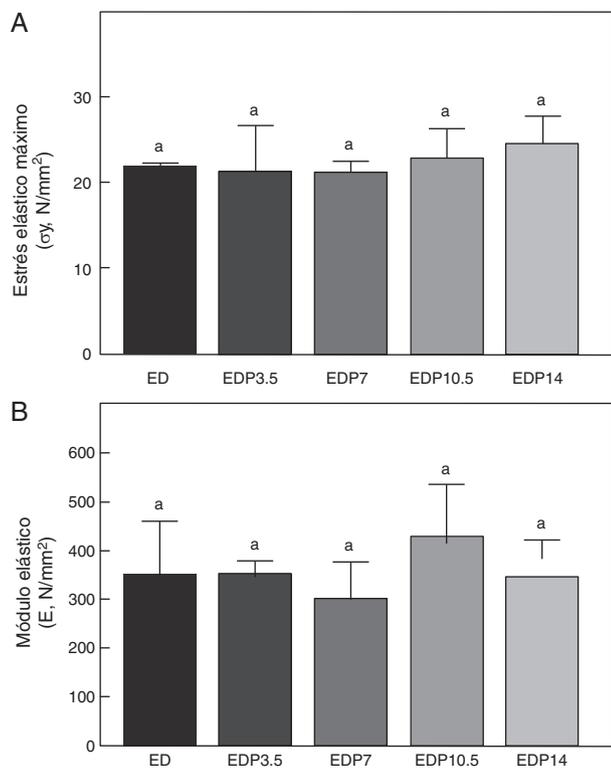


Figura 8 Propiedades materiales. A: estrés elástico máximo (σ_y) y B: módulo elástico (E), del fémur de animales experimentales ED + propranolol 3,5 mg/kg/día (EDP3,5); experimentales ED + propranolol 7 mg/kg/día (EDP7); experimentales ED + propranolol 10,5 mg/kg/día (EDP10,5); experimentales ED + propranolol 14 mg/kg/día (EDP14) expresadas como porcentaje de incremento de dichas variables respecto de las correspondientes a ED a tiempo final (T4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos, donde ED = a ($p < 0,05$).

de un control β -adrenérgico sobre el hueso, el objetivo del presente estudio fue determinar en un modelo animal de retraso del crecimiento, el efecto de diferentes dosis del β -bloqueante P sobre las variables antropo-morfométricas y biomecánicas óseas. Se evaluaron las posibles modificaciones de la calidad ósea relativas al uso mecánico a fin de poder inferir la dosis más adecuada que permita alcanzar la rigidez estructural apropiada como para soportar la estimulación mecánica habitual y/o máxima a la que podrían estar sometidos animales control de igual edad cronológica.

En el presente estudio la restricción impuesta fue lo suficientemente severa como para afectar negativamente el crecimiento corporal en todos los grupos de animales subalimentados tratados con P como en los ED no tratados. Se observó un comportamiento similar en el crecimiento del fémur de los animales desnutridos luego de 4 semanas de restricción. Independientemente de la condición nutricional y de la dosis de droga administrada, no se evidenciaron diferencias significativas en los parámetros mencionados entre los grupos tratados en relación a sus respectivos controles, C y ED, sugiriendo que el fármaco empleado no produciría efectos *per se* sobre el peso y la longitud corporal global y del hueso en particular. Estos resultados concuerdan con

los obtenidos por otros autores que registraron cambios en la masa ósea sin modificaciones antropométricas frente a la administración del β -bloqueante¹⁹.

En relación a las propiedades estructurales de la mediadiáfisis obtenidas a través del análisis de las gráficas carga/deformación, los resultados del presente estudio muestran que éstas se afectaron negativamente luego de 4 semanas de restricción de alimento en los animales subalimentados en relación a su respectivo control. En este sentido puede decirse que en base a los conceptos propuestos por Frost relativos al mecanismo de autocontrol de la calidad mecánica del hueso³⁹, un desajuste del mecanismo regulatorio del mecanostato óseo podría ser el resultado de una disminución de la estimulación mecánica del mismo por disminución del peso corporal de los animales ED respecto del grupo control de igual edad cronológica. Puede decirse, que a menor peso corporal, menor deformación ósea, la que sería interpretada por el osteocito como una señal de error biomecánico, con incremento de la actividad osteoclástica, aumento de la resorción ósea, lo que determinaría que el mecanostato ajuste la deformación ósea al nuevo peso corporal alcanzado por los animales ED. Sin embargo, cabe señalar que la carga de fractura femoral relativa al peso corporal no presentó diferencias significativas entre ED y su respectivo control, lo que sugiere que la resistencia efectiva del fémur a perder su integridad como cuerpo único se encuentra conservada en los animales desnutridos.

Asimismo, a igual edad cronológica, la relativamente menor rigidez ósea de los ED respecto de los animales C podría ser suficiente como para que la estructura ósea de los animales subalimentados soporte una pobre estimulación mecánica cotidiana, pero insuficiente como para soportar los esfuerzos fisiológicos habituales y/o máximos de un individuo sano y bien nutrido.

Es sabido que las propiedades estructurales del hueso entero están determinadas por la naturaleza fisicoquímica de su matriz calcificada (propiedades materiales focalizadas en la rigidez del tejido) y por la disposición arquitectónica de esa matriz en el espacio (propiedades geométricas focalizadas en la macroarquitectura)³⁷. Cualquier cambio en las propiedades estructurales óseas puede y debe ser explicado por cambios en las propiedades materiales o en las geométricas o en ambas.

En congruencia con las propiedades mecánicas analizadas, el área total y cortical, así como el momento de inercia de la sección transversa fueron significativamente menores en los animales ED en comparación a sus respectivos controles, lo que puede ser el reflejo de una menor masa ósea con alteración de la distribución espacial de dicha masa en el modelo animal de ED.

Al analizar el área de la sección transversa de la mediadiáfisis femoral, se observó que el ancho de la pared cortical fue aproximadamente un 30% menor en los animales ED respecto de los controles. El mismo se incrementó significativamente frente a la administración de P en dosis de 7 y 10,5 mg/kg/día sugiriendo una mayor masa ósea por aposición perióstica y/o disminución de la resorción en presencia del β -bloqueante en el presente modelo experimental. Similares resultados se observaron frente a la administración de bajas dosis del β -bloqueante, pero por un tiempo más prolongado en ratas adultas ovariectomizadas^{30,40}.

La ausencia de diferencias significativas en el ancho medular de la sección transversa entre ED y C, sugiere que la menor masa ósea observada en los animales subalimentados, podría ser el resultado de una menor formación ósea y/o incremento de la resorción subperióstica sin variaciones en la superficie endóstica.

Si bien no se observan diferencias significativas en el área cortical de la sección transversa ni en el momento de inercia entre los grupos EDP7 y EDP10,5, dichas variables muestran una tendencia a ser superior en el primer grupo respecto del segundo, lo que sugiere un mejor diseño arquitectónico del material óseo mineralizado en las ratas subalimentadas tratadas con 7 mg/kg/día de P.

En relación a los indicadores de las propiedades materiales del hueso cortical, el módulo elástico (indicador de la rigidez intrínseca del material óseo) y el estrés elástico máximo (indicador indirecto de la resistencia del tejido óseo), los mismos no fueron afectados ni por la restricción de alimento, al igual que lo observado en estudios previos realizados en nuestro laboratorio², ni por la administración de la droga. La ausencia de diferencias en las propiedades materiales en los animales subalimentados tratados con P sugiere que el incremento de la capacidad resistiva de la diáfisis femoral estaría directamente relacionado con un incremento de la masa ósea cortical y una mayor eficiencia del diseño arquitectónico.

La concepción actual del esqueleto sostiene que el mismo está dinámicamente regulado por las deformaciones producidas por el uso muscular regional con el propósito de optimizar la eficiencia mecánica del diseño arquitectónico en función de la carga que soportan las regiones óseas, representando la contracción muscular la carga fisiológica más importante ejercida sobre el hueso⁴¹⁻⁴⁴.

Si bien, como se mencionó previamente, la capacidad resistiva ósea de los animales ED relativa al tamaño corporal alcanzado podría ser suficiente para soportar fuerzas mecánicas diarias de baja intensidad, esta condición de la estructura ósea no sería la adecuada para soportar la estimulación mecánica máxima a la que podrían estar sometidos animales de igual edad cronológica. El aumento de la capacidad resistiva en los animales EDP7 y EDP10,5 respecto de los ED sugiere que la aptitud mecánica de los animales subalimentados tratados con P 7 y 10,5 mg/kg/día ha sido optimizada o mejorada para los posibles esfuerzos fisiológicos máximos, con el consiguiente mantenimiento de una deformabilidad ósea alejada del nivel crítico que pueda llegar a resultar en una fractura. Sin embargo, al analizar el efecto de la dosis de P a la cual se alcanzó la mayor capacidad resistiva del fémur, 7 mg/kg/día durante 4 semanas, sobre la masa muscular de los animales ED, se observó que dicha masa relativa al peso corporal no varió respecto de ED y de C. En efecto, el peso del cuádriceps/peso corporal (mg/g) de EDP7 vs ED vs C fue de $2,70 \pm 0,09$ vs $2,63 \pm 0,06$ vs $2,80 \pm 0,11$, respectivamente ($p > 0,05$). Dichos resultados sugieren que el P ejercería un efecto sobre el estado funcional del mecanostato óseo, el cual no se llevaría a cabo a través de una modificación del entorno mecánico. La incorporación modelatoria de hueso en los animales EDP7 podría ser el resultado de una modificación de la percepción de la magnitud de la deformación, del punto de referencia biomecánico por disminución del umbral mecánico remodelatorio y/o de la respuesta de los efectores

osteoclastos-osteoblastos en el presente modelo de estrés nutricional.

Si bien Frost caracterizó el modelado y remodelado óseos como dos procesos efectores dinámicos con participación de los osteoclastos y osteoblastos en la resorción y formación de hueso³⁹, en la actualidad aún existe controversia sobre el papel de dichos mecanismos en situaciones mecánicas como en el modo desuso observado en los animales ED. El estudio del comportamiento de los osteocitos como células mecanosensoras óseas permitiría la comprensión del mecanismo operacional del mecanostato en la adaptación funcional del hueso a la carga a soportar por el portante.

Existe evidencia que sugiere que la apoptosis del osteocito es necesaria para que el proceso de resorción sea iniciado en situaciones de deformaciones óseas inferiores al umbral mecánico remodelatorio⁴⁵. Si bien se desconoce el mecanismo por el cual la célula mecanosensora muere en situación de desuso mecánico, un inadecuado aporte nutricional, así como de remoción de los productos metabólicos del osteocito, podrían ser la causa, al menos en parte, de la disminución de la sobrevivencia de dicha célula. En este sentido, podría decirse que el P administrado en dosis de 7 mg/kg/día en los animales EDP7 tendría el efecto antiapoptótico más adecuado, responsable de la viabilidad del mecanosensor con el consiguiente incremento de la calidad ósea en las ratas ED.

Desde una concepción farmacodinámica, la menor rigidez estructural observada en los animales EDP10,5 respecto de EDP7 podría ser el resultado de una eficacia intrínseca diferencial del P dosis-dependiente relativa a la interacción ligando-receptor-cascada de señalización intracelular y/o a la regulación de receptores β -adrenérgicos. En efecto, el P podría comportarse como un agonista inverso parcial cuando es administrado en dosis de 10,5 mg/kg/día en el presente régimen utilizado, fenómeno íntimamente relacionado con las drogas reconocidas por receptores acoplados a la proteína G. En efecto, los estudios recientes evidencian la participación de numerosos antagonistas β -adrenérgicos, incluido el P, los cuales mediante una actividad de agonistas parciales ejercerían una disminución de los niveles de AMPc con incremento de la señalización de la MAPKinas a través del reclutamiento de β -arrestinas⁴⁶.

Los resultados del presente estudio evidencian que el P en dosis de 3,5 mg/Kg/día no produce modificaciones en la calidad mecánica del fémur de ratas ED. Dicha respuesta podría ser la consecuencia de una dosis insuficiente como para producir un efecto benéfico del P sobre el esqueleto apendicular. Asimismo, la ausencia de respuesta observada en los animales EDP14 respecto de EDP7 podría deberse a que el β -bloqueante empleado administrado en dosis de 14 mg/kg/día se comportaría como un agonista inverso total y/o a fenómenos de sensibilización de adrenoceptores.

Puede concluirse, que el P de 7 mg/kg/día sería la dosis más efectiva en la incorporación modelatoria de hueso con incremento de la eficiencia estructural y mecánica del esqueleto apendicular en el presente modelo animal de retraso del crecimiento. Dicho efecto podría ser el resultado del mantenimiento de la viabilidad del mecanosensor, de modificaciones de su sensibilidad a la deformación, del punto de referencia biomecánico y/o de la respuesta de los efectores en las ratas ED.

Financiación

Este trabajo fue financiado con fondos de la Universidad de Buenos Aires (Proyecto UBACyT 0004).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Graciela Champin por su asistencia técnica.

Bibliografía

- Bonjour JP, Ammann P, Chevalley T, Rizzoli R. Protein intake and bone growth. *Can J Appl Physiol.* 2001;26:153-66.
- Boyer PM, Compagnucci GE, Olivera MI, Bozzini C, Roig MC, Compagnucci CV, et al. Bone status in an animal model of chronic sub-optimal nutrition: a morphometric, densitometric and mechanical study. *Br J Nutr.* 2005;93:663-9.
- Compagnucci G, Compagnucci C, Olivera M, Roig M, Bozzini C, Boyer P, et al. Estudio comparativo morfométrico, densitométrico y biomecánico del esqueleto apendicular y axial en un modelo animal de enanismo por desnutrición. *Revista Argentina de Osteología.* 2005;4:10-24.
- Alippi RM, Meta MD, Bozzini C, Olivera MI, Ferretti JL, Bozzini CE. Dynamics of recovery of morphometrical variables and pQCT derived cortical bone properties after a short-term protein restriction in maturing rats. *Growth Dev & Aging.* 2001;65:67-72.
- Ferretti JL, Tessaro RD, Delgado CJ, Bozzini CE, Alippi RM, Barcelo AC. Biomechanical performance of diaphyseal shafts and bone tissue of femurs from protein-restricted rats. *B Miner.* 1988;4:329-39.
- Ferretti JL, Capozza R, Cointy G, Bozzini C, Alippi RM, Bozzini CE. Additive effects of dietary protein and energy deficiencies on diaphysis and bone tissue of rat femurs as determined by bending tests. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 1991;41:253-62.
- Gass M, Dawson-Hughes B. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview. *Am J Med.* 2006;119:S3-11.
- Bonura F. Prevention, screening, and management of osteoporosis: an overview of the current strategies. *Postgrad Med.* 2009;121:5-17.
- Pugliese MT, Weyman-Daum M, Moses N, Lifshitz F. Parental Health beliefs as a cause of nonorganic failure to thrive. *Pediatrics.* 1987;80:175-82.
- Lifshitz F, Moses N, Cervantes C, Ginsberg L. Nutritional dwarfing in adolescents. *Semin Adolesc Med.* 1987;3:255-66.
- Lifshitz F, Moses N. Growth, dieting and fear of obesity. *J Am Coll Nutr.* 1988;7:367-76.
- Lifshitz F, Moses N. Growth failure: a complication of dietary treatment of hypercholesterolemia. *Am J Dis Child.* 1989;143:537-42.
- Friedman SM, Rodríguez PN, Olivera MI, Bozzini C, Norese F, Gamba CA, et al. Enanismo por desnutrición: cronodinamia de los procesos metabólicos en ratas. *Medicina (Buenos Aires).* 1998;58:282-6.
- Compagnucci CV, Compagnucci GE, Lomniczi A, Mohn C, Vacas I, Cebral E, et al. Effect of nutritional stress on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the growing male rats. *Neuroimmunomodulation.* 2002-2003;10:153-62.
- Compagnucci CV, Compagnucci GE, Lezón CE, Chiarenza AP, Elverdin JC, Boyer PM. Actividad del sistema neuronal LHRH en un modelo animal de retraso del crecimiento. *Endocrinol Nutr.* 2010;57:187-95.
- Compagnucci GE, Compagnucci CV, Olivera MI, Roig MC, Mandalunis P, Morgazo C, et al. Posible regulación neural y/o humoral de la aptitud biomecánica del esqueleto apendicular en un modelo de desnutrición leve y crónica. *Revista Argentina de Osteología.* 2007;7:4-14.
- Olivera M, Compagnucci G, Compagnucci C, Lezón C, Mandalunis P, Hope S, et al. Hypothalamic noradrenergic hyperactivity and detrimental bone status in an animal model of nutritional growth retardation. *The Open Nutrition Journal.* 2008;2:29-36.
- Togari A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc Res Tech.* 2002;58:77-84.
- Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002;111:305-17.
- Kondo A, Togari A. In vivo stimulation of sympathetic nervous system modulates osteoblastic activity in mouse calvaria. *Am J Physiol.* 2003;285:E661-7.
- Elefteriou F. Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:2339-49.
- Togari A, Arai M, Kondo A. The role of the sympathetic nervous system in controlling bone metabolism. *Expert Opin Ther Targets.* 2005;9:931-40.
- Chenu C, Marenzana M. Sympathetic nervous system and bone remodeling. *Joint Bone Spine.* 2005;72:481-3.
- Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M, Togari A. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;61:579-86.
- Sandhu HS, Herskovits MS, Singh IJ. Effect of surgical sympathectomy on bone remodeling at rat incisor and molar root sockets. *Anat Rec.* 1987;219:32-8.
- Cherruau M, Morvan FO, Schirar A, Saffar JL. Chemical sympathectomy-induced changes in TH-, VIP-, and CGRP-immunoreactive fibers in the rat mandible periosteum: influence on bone resorption. *J Cell Physiol.* 2003;194:341-8.
- Graham S, Hammond-Jones D, Gamie Z, Polyzois I, Tsiridis E, Tsiridis E. The effect of beta-blockers on bone metabolism as potential drugs under investigation for osteoporosis and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17:1281-99.
- Bonnet N, Gadois C, McCloskey E, Lemineur G, Lespessailles E, Courteix D, et al. Protective effect of beta blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. *Bone.* 2007;40:1209-16.
- Bonnet N, Benhamou CL, Malaval L, Goncalves C, Vico L, Eder V, et al. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *J Cell Physiol.* 2008;217:819-27.
- Pierroz DD, Boussein ML, Rizzoli R, Ferrari SL. Combined treatment with a beta-blocker and intermittent PTH improves bone mass and microarchitecture in ovariectomized mice. *Bone.* 2006;39:260-7.
- Tatsumi S, Ito M, Asaba Y, Tsutsumi K, Ikeda K. Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone metabolism in rodents. *Endocrinology.* 2008;149:634-41.
- Lezón C, Olivera M, Bozzini C, Mandalunis P, Alippi R, Boyer P. Improved bone status by β -blocker propranolol in an animal model of nutritional growth retardation. *Br J Nutr.* 2009;101:1616-20.
- Hill EL, Turner R, Elde R. Effects of neonatal sympathectomy and capsaicin treatment on bone remodeling in rats. *Neuroscience.* 1991;44:747-55.
- Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS, et al. Beta-blocker use, BMD and fractures in

- the Study of Osteoporotic Fractures (SOF). *J Bone Miner Res.* 2003;20:613–8.
35. Levasseur R, Dargent-Molina P, Sabatier JP, Marcelli C, Breart G. Beta-blocker use, bone mineral density, and fracture risk in older women: results from the epidemiologie de l'Osteoporose prospective study. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53:550–2.
 36. National Institutes of Health. Laboratory animal welfare: Public Health Service policy on humane care and use of laboratory animals by award institutions. 1985, revised 1990. NIH "Guidelines for the care and use of laboratory animals".
 37. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone.* 1993;14:595–608.
 38. Sokal R, Rohlf J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* 3rd ed. New York: Freeman; 1995.
 39. Frost HM. *Introduction to a new skeletal physiology.* Pueblo, Colorado, U.S.A.: Pájaro Group, editors; 1995.
 40. Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D. Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318:1118–27.
 41. Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Capiglioni R, Chiappe MA. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1:263–74.
 42. Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Frost HM. Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. *Mech Ageing Dev.* 2003;124:269–79.
 43. Schoenau E, Fricke O. Mechanical influences on bone development in children. *European Journal of Endocrinology.* 2008;159:S27–31.
 44. Qin Y-X, Lam H, Ferreri S, Rubin C. Dynamic skeletal muscle stimulation and its potential in bone adaptation. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2010;10:12–24.
 45. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 2007;5:464–75.
 46. Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ, Violin JD, Drake MT, Ahn S, et al. A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:16657–62.