
ARTÍCULO ORIGINAL

Modificación del mecanismo operacional del mecanostato óseo en un modelo de estrés nutricional por efecto del propranolol

Patricia Mabel Pintos,* Christian Esteban Lezón,*
Clarisa Bozzini,* Silvia María Friedman,** Patricia Mónica Boyer*

* Cátedra de Fisiología, ** Cátedra de Bioquímica y Biología Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Operational mechanism modification of bone mechanostat in an animal model of nutritional stress: effect of propranolol

ABSTRACT

Introduction. Propranolol (P) treatment exerts a preventive effect against the detrimental consequences to bone status in mildly chronically food-restricted growing rats (NGR) by an increment in cortical bone and by improving its spatial distribution. **Objective.** To study the effect of β -blocker on operational mechanism of bone mechanostat in an animal model of nutritional stress. **Material and methods.** Weanling male Wistar rats were randomly assigned to four groups: control (C), C + P (CP), NGR and NGR + P (NGRP). C and CP rats were fed freely with the standard diet. NGR and NGRP rats received, for 4 weeks, 80% of the amount of food consumed by C and CP respectively, the previous day, corrected by body weight. Propranolol (7 mg/kg/day) was injected ip 5 days per week, for four weeks in CP and NGRP rats. C and NGR received saline injections at an identical dosage regimen. Body weight and length were determined during the experimental period. Dietary intake was registered daily. Animals were sacrificed after 4 weeks of food restriction. Immediately, quadriceps, femur and tibiae from each animal were dissected and weighed, and histomorphometric and mechanical studies were performed. Serum α -CTX, osteocalcin, intact PTH, calcium and phosphorous were determined. Body protein (% prot) was measured in all groups. **Results.** Food restriction induced detrimental effects on body and femoral growth, load-bearing capacity (Wf), % prot and quadriceps weight in NGR vs. C ($p < 0.01$). β -blocker did not modify anthropometric and bone morphometric parameters in NGRP and CP vs. NGR and C, respectively ($p > 0.05$). However, Wf NGRP vs. NGR was significantly higher ($p < 0.01$). α -CTX was significantly higher in NGR vs. C ($p < 0.01$). No significant differences were observed in α -CTX levels between CP, NGRP and C ($p > 0.05$). Serum osteocalcin, intact PTH, calcium and phospho-

RESUMEN

Introducción. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se evidenció el efecto benéfico del propranolol (P) sobre la competencia biomecánica ósea a través del incremento de la masa cortical y de la optimización de su distribución espacial en un modelo animal de retardo del crecimiento de origen nutricional (RCCN). **Objetivo.** Evaluar la acción del β -bloqueante sobre el mecanismo operacional del mecanostato óseo en ratas RCCN. **Material y métodos.** Ratas macho Wistar de 21 días; se dividieron en control (C), C + P (CP), RCCN y RCCN + P (RCCNP). C con/sin P fueron alimentados *ad libitum*; RCCN con/sin P recibieron 80% de la dieta de C durante cuatro semanas. P 7 mg/kg/día, fue inyectado ip por cuatro semanas en CP y RCCNP. Al tiempo final se determinaron peso y longitud corporales, se extrajeron el cuadriceps, el fémur y la tibia. Se determinó la morfometría del fémur, así como su resistencia a la fractura (Wf) mediante un ensayo de flexión a tres puntos (Equipo Instron 4442). Se determinaron el ancho de cartílago de crecimiento y el volumen óseo subcondral mediante histomorfometría estática en tibia y el peso muscular. En suero se determinaron α -CTX, osteocalcina, PTH intacta, calcio y fósforo. Se determinó la proteína corporal (% prot) en los distintos grupos. **Resultados.** La restricción global afectó negativamente el crecimiento corporal, femoral y su capacidad resistiva, % prot y peso del cuadriceps en RCCN ($p < 0.01$). P no modificó los parámetros morfo-antropométricos ni % prot en RCCNP y CP vs. RCCN y C, respectivamente ($p > 0.05$). Sin embargo, Wf de RCCNP vs. RCCN fue significativamente mayor ($p < 0.01$). α -CTX fue significativamente mayor en RCCN vs C ($p < 0.01$). No hubo diferencias significativas en α -CTX entre CP, RCCNP y C ($p > 0.05$). Osteocalcina, PTHi, calcemia y fosfatemia no presentaron diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$). **Conclusión.** Los resultados del presente estudio sugieren que el propranolol 7 mg/kg/día permitiría la incorporación modelatoria de hueso con optimización de su diseño arquitectónico, a través de una interacción anticatabólica del

rous showed no significant difference between groups ($p > 0.05$). **Conclusion.** These results suggest that modeling increase in bone mass and strength in NGRP rats could be due to an antacatabolic interaction of the β -blocker propranolol on operational mechanism of bone mechanostat in an animal model of nutritional stress.

Key words. Nutritional growth retardation. Propranolol. Bone status. Bone mechanostat. Bone turn over biomarkers.

INTRODUCCIÓN

La aptitud mecánica de los huesos, propiedad relativa a su función de sostén, está determinada por la capacidad resistiva de los mismos a la fractura frente a la aplicación de una carga.¹

Se sabe que la resistencia a la fractura depende de la resistencia a la deformación, vale decir, de la rigidez ósea; ésta, determinada por la naturaleza fisicoquímica de su matriz calcificada y por la disposición arquitectónica de esa matriz en el espacio.²

La adquisición de una rigidez ósea estructural óptima está determinada por el funcionamiento apropiado del mecanostato óseo descrito por Frost.³⁻⁵ Dicho mecanismo de regulación de la función de sostén esquelética es determinante de la eficiencia mecánica ósea y tiene por propósito mantener la integridad física del hueso (Figura 1).

β -bloqueante con el mecanismo homeostático de control de la rigidez ósea en el presente modelo animal de retraso del crecimiento.

Palabras clave. Retraso del crecimiento. Propranolol. Calidad ósea. Mecanostato óseo. Biomarcadores de remodelado óseo.

Con base al control homeostático de la rigidez estructural esquelética, los huesos son estructuras dinámicamente reguladas en función de las deformaciones provocadas por el uso muscular regional, cuyo resultado es un constante modelado o remodelado de la estructura ósea, a nivel cortical como trabecular, con el propósito de optimizar la eficiencia mecánica del diseño arquitectónico en función de la carga mecánica que las regiones óseas soportan; la contracción muscular es la carga fisiológica más importante ejercida sobre el hueso.⁶⁻⁹ Una modificación del entorno mecánico sería sensada por el osteocito, que interpretaría la señal mecánica como adecuada o errónea en relación con un punto de referencia biomecánico. En caso de ser errónea, dicho mecanosensor enviaría mediadores químicos estimuladores o inhibidores de la incorporación de hueso a los efectores celulares, osteoclastos y osteoblastos,

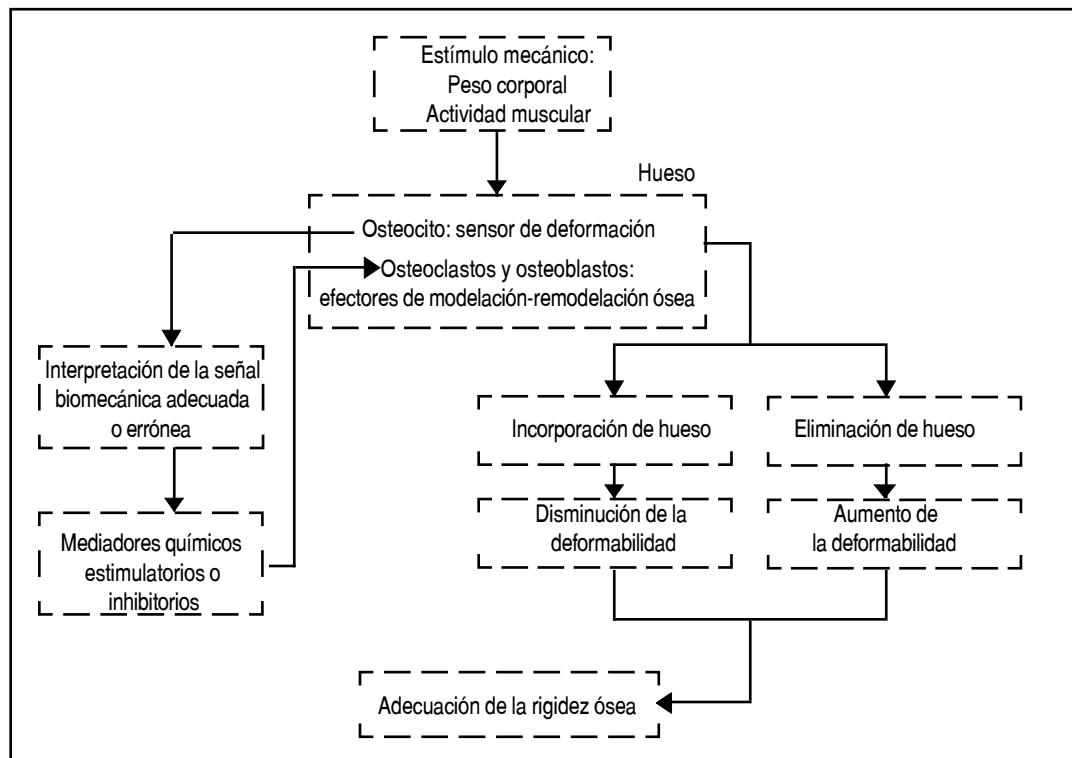


Figura 1. Esquema del funcionamiento del mecanostato óseo según Frost.

con la consiguiente deformabilidad típica y optimización de la rigidez ósea.

En función del equilibrio mineral, la actividad de las células óseas efectoras está modulada por los sistemas endocrino-metabólicos.

Determinadas creencias y prácticas impuestas a los hijos por los padres pueden restringir la nutrición del niño al punto de inducir un retraso crónico del crecimiento de origen nutricional (RCCN). Esta enfermedad se caracteriza por una desaceleración en el crecimiento corporal con retraso en el desarrollo puberal, sin evidencia de falla orgánica ni alteraciones en los marcadores bioquímicos de desnutrición.¹⁰⁻¹³

En nuestro laboratorio se ha descrito un modelo de RCCN en ratas, el cual recrea al RCCN 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 RCCN se logró por la administración crónica de una dieta balanceada a ratas recién destetadas, con restricción global de 20% comparada con los requerimientos energéticos de animales de igual edad.¹⁴

Se sabe que la incorporación de hueso, así como la determinación de su calidad durante el crecimiento, está afectada por la condición nutricional del individuo y la acción de estímulos mecánicos, entre otros factores.^{8,15-19}

En estudios biomecánicos previos realizados en nuestro laboratorio se observó una alteración de la distribución espacial de la masa ósea con disminución de la competencia mecánica para soportar fuerzas deformantes en el fémur de ratas RCCN.^{15,20-22} La resistencia ósea de dichas ratas desnutridas aumentó frente a la administración crónica de 7 mg/kg/día de propranolol,²² quizá como consecuencia de un efecto del fármaco sobre el estado funcional del mecanostato óseo.

Debido a la relación existente entre la condición nutricional del individuo y la rigidez estructural ósea, y a la evidencia de la acción del propranolol relativa al incremento de la resistencia ósea del esqueleto apendicular en el presente modelo de retraso del crecimiento de origen nutricional, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del β -bloqueante propranolol sobre la eficiencia del mecanostato óseo en la optimización del diseño arquitectónico diafisario por unidad de material óseo cortical disponible y relativo a la calidad del material óseo, la actividad remodelatoria de las células óseas efectoras y las posibles modificaciones del entorno endocrino-metabólico en ratas RCCN.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar desde el destete de 21-23 días de edad [peso inicial: 46.70 g \pm 1.80, media \pm error estándar (ES)] provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los animales se mantuvieron en jaulas galvanizadas en condiciones higiénicas apropiadas para evitar la coprofagia. Se respetaron los ciclos 12:12 h de luz-oscuridad. La temperatura ambiental se mantuvo a 21 \pm 1 °C, con humedad relativa de 50-60%. El uso, cuidado y tratamiento de los animales experimentales se realizó de acuerdo con las normas del *National Institutes of Health*,²³ 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/100 g de dieta):

- Proteína: 25,40.
- Lípidos: 6,90.
- Fibra: 4,80.
- Ca: 1,30.
- P: 0,80.
- Cenizas: 5,50.
- Agua: 8,30.
- Dextrina csp 100.

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

Diseño experimental

Setenta y dos ratas fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos, control y experimental, de 36 animales cada uno. Cada grupo se subdividió en dos subgrupos, según recibieran vehículo o propranolol (P; Laboratorios Richmond, Argentina) 7 mg/kg/día. Los grupos resultantes fueron:

- Control + vehículo (C).
- Control + P (CP).

- Experimentales RCCN + vehículo (RCCN).
- Experimentales RCCN + P (RCCNP).

El propanolol fue inyectado intraperitonealmente cinco días por semana durante cuatro semanas en las dosis mencionadas. C y RCCN recibieron solución salina con idéntico régimen. C con/sin P fueron alimentados con una dieta estándar en condiciones de libre demanda; RCCN con/sin P recibieron 80% de la dieta consumida por C el día previo corregido por el peso corporal (consumo en g/100 g peso corporal/día), durante cuatro semanas. Se realizó el registro diario de la ingesta de alimento, y cada dos y cuatro 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, Konig Lab. Buenos Aires, Argentina, a las cuatro semanas experimentales (T4). Inmediatamente, a diez animales de cada grupo se les extrajo sangre por punción cardiaca, se separó el suero, el cual fue almacenado a -20 °C hasta las determinaciones bioquímicas. De cada animal, se extrajeron los cuádriceps, los fémures y las tibias. Los cuádriceps fueron pesados. Ambos huesos fueron disecados, evitando lesionar el periostio y medidos con un calibre digital. Los fémures se almacenaron a -20 °C envueltos en gasa embebida en solución Ringer en bolsas plásticas selladas acorde con Turner y Burr² hasta la realización del ensayo biomecánico. Las tibias se emplearon para la determinación del ancho cartílago de crecimiento y volumen óseo subcondral por histomorfometría estática. Un subgrupo de animales restante (n = 8) se empleó para la determinación de la proteína corporal.

Determinación de la carga mecánica

- **Determinación del peso corporal.** Para el registro del peso (g) se utilizó una balanza Mettler PC 4000 con una precisión de ± 1 mg, con una frecuencia de medición de cuatro días, guardando un ayuno mínimo de 2 h y máximo de 4 h, previo a la medición.
- **Determinación de la actividad muscular.** Inferida mediante la determinación del peso del cuádriceps (g) y el porcentaje de proteína corporal (mg%) determinado por el método de Kjeldahl, mediante la oxidación húmeda de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, la alcalinización con hidróxido de sodio, la destilación y valoración del amoníaco liberado.²⁴

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 4442.² El día del ensayo biomecánico cada fémur fue descongelado a temperatura ambiente y 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) permitieron determinar las siguientes variables representativas de las propiedades estructurales del hueso entero:

- Carga a fractura (W_f, N).
- Máxima carga elástica (W_y, N).
- Energía de deformación elástica (W_y.dy/2, Nxmm).
- Rigididad ósea (W_y/dy, N/mm).

Donde dy representa la máxima deformación elástica.

Se efectuaron cortes a nivel de la media diáfisis femoral utilizando una microsierra de punta de diamante Isomet (Buehler, Lake Bluff, IL, USA), 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:

$$\pi/4 \cdot V \cdot H.$$

- Momento de inercia axial (I_x, mm⁴), estimado mediante la fórmula:

$$I_x = \pi (V^3 H - v^3 h)/64.$$

- Área medular (MA, mm²), estimada como:

$$MA = \pi/4 \cdot v \cdot h.$$

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 de Young (E, MPa), estimado por la fórmula:

$$E = Wy \cdot L^3 / 48 dy \cdot I_x$$

Donde:

Wy = máxima carga elástica.
L = longitud del hueso.
dy = máxima deformación elástica.
Ix = momento de inercia axial.

- Estrés elástico máximo (σ_y , MPa), estimado mediante la fórmula:

$$\sigma_y = L \cdot V \cdot Wy / 8 \cdot I_x$$

Donde V es el diámetro externo vertical.

Evaluación de la eficiencia mecánica del mecanostato óseo

La misma fue evaluada mediante las curvas distribución/masa y distribución/calidad.²⁶ La curva distribución/masa evalúa la eficiencia del mecanostato óseo en la optimización del diseño arquitectónico diafisario por unidad de material óseo cortical disponible. La coincidencia de pendientes entre dos curvas, experimental y control, sugiere que un determinado tratamiento no interfiere en el control del modelado-remodelado por el mecanostato óseo. Del mismo modo, a mayor pendiente, mayor sería la eficiencia del mecanostato óseo en estimular el proceso de modelado óseo. Por el contrario, una menor pendiente sugiere una interacción negativa del tratamiento con el mecanosensor y/o con las células efectoras óseas, con el consiguiente impacto sobre la distribución de la masa ósea.

La curva distribución/calidad evalúa la distribución arquitectónica diafisaria en función de la calidad del material óseo. Un corrimiento de la curva hacia arriba-derecha o abajo-izquierda del gráfico indicaría un corrimiento anabólico (o anticatabólico) o catabólico (o antianabólico), respectivamente, del punto de referencia del mecanostato óseo.

El momento de inercia axial (I_x , mm⁴), el área ósea total de sección transversa (CSA, mm²) y el módulo de Young (E, MPa) fueron empleados como va-

riables para evaluar la distribución del diseño arquitectónico óseo, el material cortical disponible y la calidad del material óseo, respectivamente.

Evaluación del crecimiento longitudinal

La longitud corporal fue registrada en función de la distancia entre el hocico y los pelos de la base de la cola durante el periodo experimental. Para la medición de la longitud femoral, a T4 se realizó la ablación de los huesos y se los liberó de tejido muscular y tendinoso. Se registró su longitud mediante un calibre micrométrico digital con una precisión de 0.05 mm.

Se realizaron estudios histomorfométricos estáticos en tibia de animales C, CP, RCCN y RCCNP a T4. Se disecaron los huesos y se fijaron inmediatamente en formol neutro al 10%, se descalificaron en EDTA (etilen-diamino-tetracético) al 10%, pH 7.2, durante 25 días se incluyeron en parafina. Una vez obtenidos los tacos, se realizaron cortes de orientación longitudinal en tibia. Posteriormente, se montaron en portaobjetos y se colorearon con hematoxilina y eosina. Los preparados histológicos se observaron con un microscopio modelo CX31, versión trinocular Olympus y se fotografiaron con una cámara digital Lumenera Infinity 1.2 Olympus para uso en microscopía. Se evaluó el ancho de cartílago en reposo-proliferativo e hipertrófico (aumento 100x) y el volumen óseo en el hueso subcondral (aumento 50x). El ancho de cartílago en reposo-proliferativo e hipertrófico fue evaluado en el área central del cartílago de crecimiento de tibias sobre imágenes de microfotografías digitalizadas, empleando el programa computarizado Image-Tool (University of Texas Health Science Centre at San Antonio, UTHSCA). El ancho de los cartílagos de los animales C, CP, RCCN y RCCNP fue determinado mediante trece mediciones efectuadas sobre rectas paralelas de orientación vertical, previamente trazadas entre dos puntos ubicados sobre los límites superior e inferior del área de estudio, distantes una de otra por 1.50 cm.²⁵ El porcentaje de volumen óseo se determinó sobre una superficie constante en cada foto histológica impresa en iguales dimensiones, en el cual se delimitaron las trabéculas óseas para su posterior medición mediante el empleo de una grilla de puntos.²⁵

Determinación de marcadores óseos de modelado-remodelado

La determinación del α -telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo I (α -CTX) se realizó por el

método ELISA mediante la utilización de un avío comercial Rat-Laps, Osteometer Bio Tech, Herlev, Dinamarca, con un coeficiente de variación intraensayo de 5.8%. Los resultados se expresaron en ng/mL. La determinación de osteocalcina se realizó por el método ELISA mediante un avío comercial Rat-Osteocalcine, Osteometer Bio Tech, Herlev, Dinamarca, con un coeficiente de variación intraensayo de 6%. Los resultados se expresaron en ng/mL.

Determinación del entorno endocrino-metabólico

La PTH intacta (PTHi) se determinó por electroquimioluminiscencia (ECLIA) mediante un avío comercial (Roche, SA). Los resultados se expresaron en pg/mL. La calcemia se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) a 623 nm empleando cloruro de lantano como supresor de interferencias. Los resultados se expresaron en mg/dL. La fosfatemia se determinó por colorimetría utilizando un equipo comercial UV-visible (Wiener, SA). Los resultados se expresaron en mg/dL.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm ES. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA). *A posteriori* se empleó el test de Student-Neuman-Keuls de comparaciones múltiples. Las diferencias entre medias fueron consideradas significativas con un $p < 0.05$.²⁶ El análisis estadístico se realizó mediante el programa computarizado

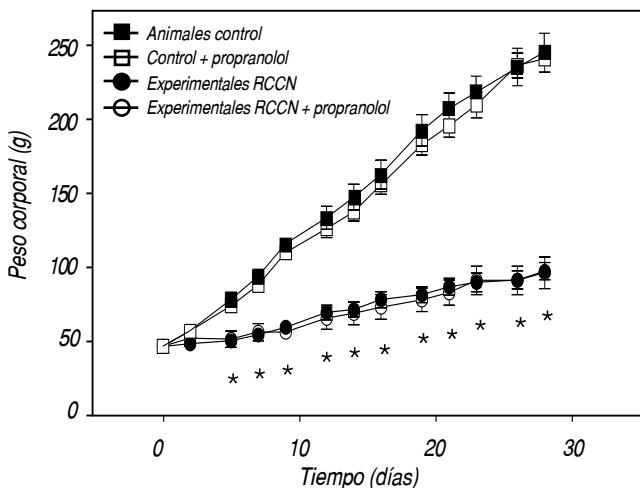


Figura 2. Curso temporal del peso corporal. Valor promedio \pm ES de 18 animales por grupo. *Diferencias significativas entre grupos RCCN respecto a C, con/sin propranolol ($p < 0.05$).

Graphpad Prism version 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

En la figura 2 se muestra el curso temporal del peso corporal de ratas control y experimentales con/sin propranolol. La restricción energética resultó en un incremento del peso corporal significativamente menor en los animales experimentales respecto de los controles ($p < 0.001$), y éste fue independiente de la administración de propranolol.

En las figuras 3A-3D se muestra el peso del cuádriceps y el contenido de proteínas corporales, absoluto y relativo al peso corporal en animales control y experimentales con/sin propranolol a T4. Se observa que el peso muscular y el contenido de proteínas corporales fueron significativamente menores en las ratas RCCN y RCCNP en comparación con sus controles C y CP, respectivamente ($p < 0.001$) (Figuras 3A y 3B). Sin embargo, la normalización de los mismos por el peso corporal, no evidenció diferencias

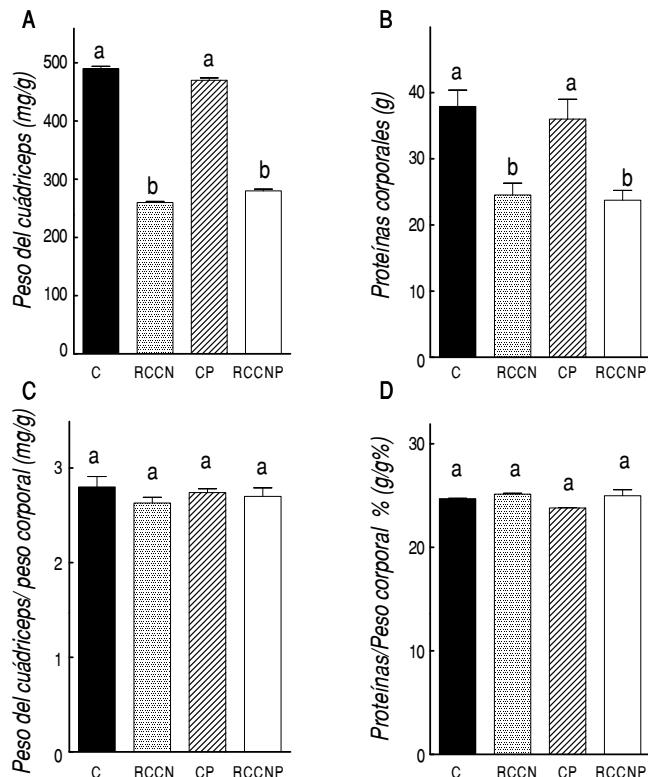


Figura 3. A. Peso del cuádriceps. B. Proteínas corporales. C. Peso del cuádriceps/Peso corporal. D. Proteínas/Peso corporal a tiempo final (T4). C: animales control. CP: control + propranolol. RCCN: experimentales RCCN. RCCNP: experimentales RCCN + propranolol. Valor promedio \pm ES de ocho animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

Cuadro 1. Propiedades estructurales, geométricas y materiales del fémur.

| Propiedades biomecánicas óseas | C | CP | RCCN | RCCNP |
|--|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| • Estructurales | | | | |
| Carga a fractura (N) | 53.36 ± 2.58 ^a | 48.30 ± 1.64 ^a | 24.16 ± 2.56 ^b | 41.30 ± 1.00 ^c |
| Máxima carga elástica (N) | 43.50 ± 5.00 ^a | 44.13 ± 3.60 ^a | 21.54 ± 3.10 ^b | 36.00 ± 1.47 ^c |
| Energía de deformación elástica (N/mm) | 11.99 ± 0.69 ^a | 12.37 ± 2.65 ^a | 3.71 ± 0.43 ^b | 10.44 ± 1.99 ^a |
| Rigidez ósea (N/mm) | 94.23 ± 9.39 ^a | 98.00 ± 5.35 ^a | 47.31 ± 9.80 ^b | 73.01 ± 10.68 ^c |
| • Geométricas | | | | |
| Área total de sección transversa (mm ²) | 13.40 ± 0.22 ^a | 13.12 ± 0.41 ^a | 9.09 ± 0.26 ^b | 11.51 ± 0.46 ^a |
| Área cortical de sección transversa (mm ²) | 9.37 ± 0.23 ^a | 8.71 ± 0.52 ^a | 5.74 ± 0.39 ^b | 7.60 ± 0.52 ^c |
| Área medular de sección transversa (mm ²) | 4.08 ± 0.46 ^a | 4.40 ± 0.79 ^a | 4.21 ± 1.30 ^a | 4.39 ± 0.80 ^a |
| Momento de inercia axial (mm ⁴) | 9.89 ± 0.59 ^a | 9.72 ± 0.92 ^a | 5.19 ± 0.48 ^b | 8.31 ± 0.66 ^c |
| • Materiales | | | | |
| Estrés elástico máximo (MPa) | 18.63 ± 0.98 ^a | 17.40 ± 0.81 ^a | 18.10 ± 1.84 ^a | 21.14 ± 1.22 ^a |
| Módulo de Young (MPa) | 241.83 ± 28.79 ^a | 285.0 ± 19.10 ^a | 352.0 ± 64.3 ^a | 259.00 ± 56.4 ^a |

C:control. CP: control + propranolol. RCCN: experimentales RCCN. RCCNP: experimentales RCCN + propranolol. A tiempo final (T4). Valor promedio ± ES de diez animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

significativas entre grupos ($p > 0.05$) (Figuras 3C y 3D). No se observaron diferencias significativas en el peso del cuadriceps y el contenido de proteínas corporales absoluto entre CP y C ($p > 0.05$) (Figuras 3A y 3B).

En el cuadro 1 se presentan las propiedades biomecánicas de la diáfisis femoral de animales control y experimentales con/sin propranolol. En congruencia con estudios previos realizados en nuestro laboratorio,¹⁵ el β -bloqueante, en el régimen utilizado, no produjo efectos sobre la competencia biomecánica ósea en los animales alimentados a libre demanda tratados con propranolol respecto de los animales control no tratados ($p > 0.05$).

Las propiedades estructurales (carga a fractura, máxima carga elástica, energía de deformación elástica y rigidez ósea) de la media diáfisis de ratas RCCN se afectaron negativamente luego de cuatro semanas de restricción de alimento ($p < 0.01$).

A T4, el área total de la sección transversa y el momento de inercia axial fueron significativamente menores en el grupo RCCN respecto de las ratas C ($p < 0.01$). No se observaron diferencias significativas en el área de la sección transversa medular entre grupos ($p > 0.05$) mientras que el área cortical de la sección transversa de la media diáfisis femoral fue significativamente menor en los RCCN vs. C ($p < 0.01$).

En lo que respecta a la calidad intrínseca del material óseo determinada por el estrés elástico máximo y el módulo de elasticidad, no hubo diferencias significativas entre grupos a tiempo final ($p > 0.05$).

Los animales subalimentados tratados con propranolol presentaron aumentos significativos ($p < 0.05$) en las variables representativas de las

propiedades estructurales del hueso entero respecto a las ratas RCCN no tratadas.

En relación con las propiedades geométricas óseas, los animales subalimentados tratados con 7 mg/kg/día de propranolol presentaron aumentos significativos en CSA, A e I_x respecto a RCCN ($p < 0.01$). El área medular no fue afectada por la restricción de alimento ni por el tratamiento con propranolol ($p > 0.05$).

Respecto de 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 propranolol y el grupo RCCN no tratado ($p > 0.05$).

En la figura 4 se presenta la evolución de la longitud corporal de los animales control y experimentales

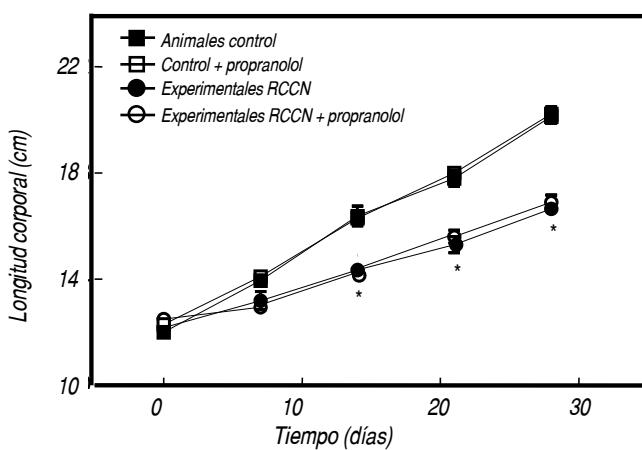


Figura 4. Curso temporal de la longitud corporal. Valor promedio ± ES de 18 animales por grupo. *Diferencias significativas entre grupos RCCN respecto a C, con/sin propranolol ($p < 0.05$).

Cuadro 2. Longitud femoral, y ancho de cartílago total, proliferativo e hipertrófico y volumen óseo subcondral de tibia.

| Morfo-histomorfometría ósea | C | CP | RCCN | RCCNP |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Longitud femoral (mm) | 28.27 ± 0.16 ^a | 27.91 ± 0.32 ^a | 24.26 ± 0.24 ^b | 24.96 ± 0.16 ^b |
| Ancho de cartílago total de tibia (μm) | 404.47 ± 6.85 ^a | 417.70 ± 5.51 ^a | 274.74 ± 5.65 ^b | 273.93 ± 3.63 ^b |
| Ancho de cartílago proliferativo de tibia (μm) | 253.14 ± 6.51 ^a | 255.46 ± 4.52 ^a | 163.79 ± 3.72 ^b | 176.07 ± 3.86 ^b |
| Ancho de cartílago hipertrófico de tibia (μm) | 163.79 ± 8.28 ^a | 156.64 ± 4.21 ^a | 112.61 ± 3.32 ^b | 101.89 ± 2.43 ^b |
| Volumen óseo subcondral de tibia (%) | 64.0 ^a 70.0 ^a | 27.0 ^b 36.0 ^b | | |

C: control. CP: control + propranolol. RCCN: experimentales RCCN. RCCNP: experimentales RCCN + propranolol. A tiempo final (T4). Valor promedio ± ES de diez animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

Cuadro 3. Determinaciones bioquímicas séricas.

| Determinaciones bioquímicas | C | CP | RCCN | RCCNP |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| α-CTX (ng/mL) | 52.36 ± 1.69 ^a | 163.50 ± 27.45 ^b | 69.90 ± 5.92 ^a | 95.40 ± 18.56 ^a |
| Osteocalcina (ng/mL) | 302.52 ± 44.49 ^a | 315.88 ± 14.34 ^a | 382.52 ± 20.50 ^a | 370.75 ± 55.11 ^a |
| PTHi (pg/mL) | 68.58 ± 3.70 ^a | 67.75 ± 5.57 ^a | 66.40 ± 3.80 ^a | 66.50 ± 3.50 ^a |
| Calcio (mg/dL) | 9.30 ± 0.23 ^a | 9.75 ± 0.10 ^a | 9.98 ± 0.24 ^a | 9.41 ± 0.18 ^a |
| Fósforo (mg/dL) | 12.17 ± 0.64 ^a | 12.05 ± 0.57 ^a | 12.23 ± 0.65 ^a | 11.60 ± 0.75 ^a |

C: control. CP: control + propranolol. RCCN: experimentales RCCN. RCCNP: experimentales RCCN + propranolol. A tiempo final (T4). Valor promedio ± ES de diez animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

con/sin propranolol durante el periodo experimental. El crecimiento longitudinal fue afectado negativamente en las ratas subalimentadas comparado con sus respectivos controles ($p < 0.001$). El tratamiento con propranolol no produjo cambios evidentes en la longitud corporal independientemente de la condición nutricional.

En el cuadro 2 se muestran la longitud femoral, y el ancho de cartílago total, proliferativo e hipertrófico, y el volumen óseo subcondral de tibia de animales control y experimentales con/sin propranolol a T4. Se observa que el crecimiento del fémur evaluado morfométrica e histológicamente fue menor en los animales RCCN vs. C ($p < 0.01$) y que el P no revirtió los efectos negativos de la restricción de alimento en las ratas RCCNP respecto de RCCN ($p > 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre CP y C ($p > 0.05$).

En el cuadro 3 se presentan los marcadores bioquímicos de recambio óseo, α-CTX y osteocalcina, así como los niveles séricos de PTHi, calcio y fósforo de suero de ratas control y experimentales con/sin propranolol a T4. Se observa un incremento significativo de α-CTX sérica en el grupo RCCN respecto de C ($p < 0.001$), con una disminución significativa de dichos niveles en las ratas RCCNP vs. RCCN ($p < 0.001$). No hubo diferencias significativas entre los grupos CP y C ($p > 0.05$).

Al analizar los niveles séricos de osteocalcina, PTHi, calcio y fósforo se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos estudiados ($p > 0.05$).

En las figuras 5A-5D se presentan las curvas que describen la eficiencia del mecanostato óseo en la optimización del diseño arquitectónico diafisario por unidad de material cortical disponible en animales control y experimentales con/sin propranolol a T4. Al comparar las curvas $I_x = f$ (CSA) correspondientes a los grupos CP vs. C (Figura 5A), se observa que no existen diferencias significativas entre las pendientes ($p > 0.05$). En efecto, $I_x = f$ (CSA) de CP vs. C fue de $y = 1.57x - 11.30$ vs. $y = 1.34x - 8.24$, respectivamente ($p > 0.05$). En la figura 5B se observa que la eficiencia en la distribución ósea por unidad de material en los animales RCCN vs. C fue significativamente menor ($p < 0.05$). En efecto, $I_x = f$ (CSA) de RCCN vs. C fue de $y = 0.82x - 2.94$ vs $y = 1.57x - 11.30$, respectivamente ($p < 0.05$). Al comparar las curvas distribución/material correspondientes a los animales RCCNP vs. RCCN (Figura 5C) se observa que la pendiente es significativamente mayor para las ratas subalimentadas tratadas con P respecto de las no tratadas ($p < 0.05$). En efecto, $I_x = f$ (CSA) de RCCNP vs. RCCN fue de $y = 1.59x - 10.66$ vs. $y = 0.82x - 2.94$, respectivamente ($p < 0.05$). No se observan diferencias significativas entre

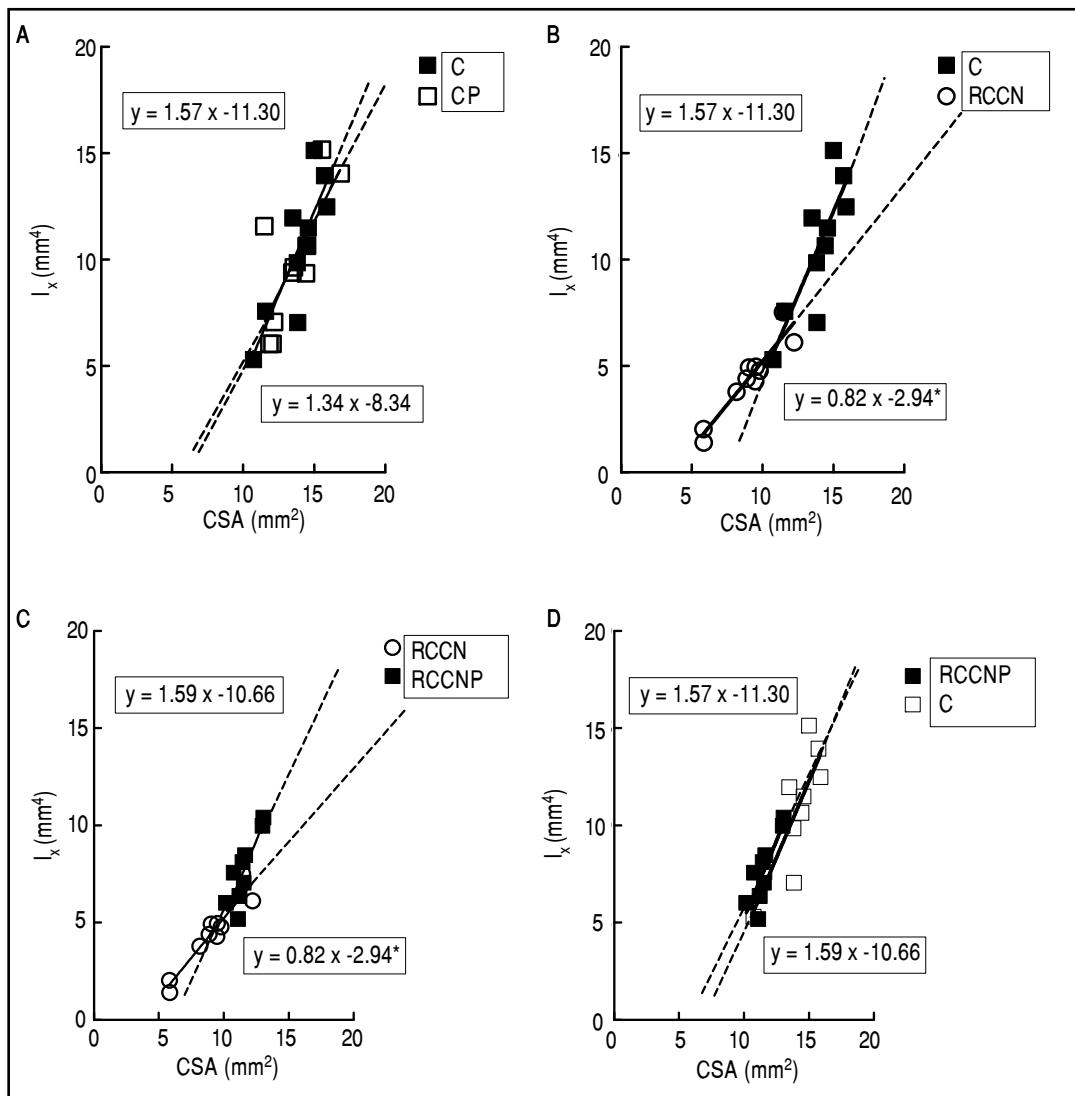
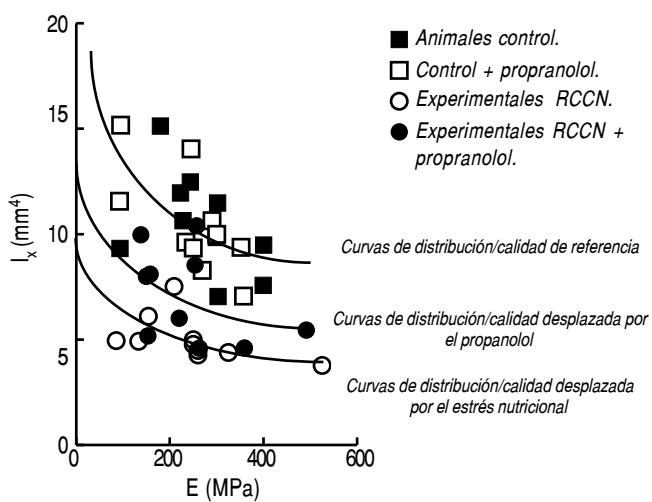


Figura 5. Eficiencia del mecanostato óseo en la optimización del diseño arquitectónico diafisario.

A. Animales control + propranolol (CP) vs. control (C). **B.** Experimentales RCCN (RCCN) vs. control (C). **C.** Experimentales RCCN + propranolol (RCCNP) vs. experimentales RCCN (RCCN). **D.** Experimentales RCCN + propranolol (RCCNP) vs. control (C). *Diferencias significativas entre pendientes ($p < 0.05$).



las pendientes de las curvas de eficiencia en la distribución ósea por unidad de material de animales RCCNP vs. C ($p > 0.05$). En efecto, $I_x = f(\text{CSA})$ de RCCN vs. C fue de $y = 1.59x-10.66$ vs. $y = 1.57x-11.30$, respectivamente ($p > 0.05$).

En la figura 6 se presentan las curvas de distribución arquitectónica diafisaria en función de la calidad del material óseo correspondientes a animales control y experimentales con/sin propranolol a T4. Se observa un desplazamiento de la curva distribución/calidad hacia abajo y a la izquierda en los animales RCCN respecto de la curva de referencia. Asimismo, se observa un desplazamiento hacia arriba y a la derecha de dicha curva en los animales RCCNP respecto del grupo RCCN.

DISCUSIÓN

El hueso es un tejido dinámicamente regulado que cumple funciones de soporte corporal, de inserción muscular para una adecuada locomoción, de protección de órganos vitales y hematopoyética. Estudios recientes han demostrado la función endocrina del esqueleto mediante su participación en la regulación del metabolismo glucídico.²⁷

Es sabido que la eficiencia estructural y mecánica esquelética está controlada por un mecanismo homeostático de calidad ósea, determinada por las características esqueléticas del material duro y del diseño arquitectónico del mismo.²⁸

Los huesos experimentan deformaciones en respuesta a las cargas que soportan, y controlan su rigidez orientando la actividad de las células óseas en función del sentido direccional de la fuerza aplicada, inferida por las deformaciones habituales determinadas por la gravedad y las contracciones musculares. La rigidez ósea alcanzada es adecuada cuando representa la necesaria y suficiente como para mantener la integridad física del hueso en respuesta a la carga; la resistencia a la fractura y la masa ósea alcanzadas constituyen el resultado de este mecanismo de control.^{3,6,7,29-31}

En el presente estudio se evaluó el efecto del β-bloqueante propranolol sobre la eficiencia del mecanostato óseo en la optimización del diseño arquitectónico diafisario por unidad de material óseo cortical disponible y relativo a la calidad del material óseo, la actividad remodelatoria de las células óseas efectoras y las posibles modificaciones del entorno endocrino-metabólico en ratas RCCN.

Los resultados obtenidos evidencian que la restricción de alimento indujo una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) de la velocidad de crecimiento en los animales experimentales respecto de las ratas control. En efecto, los animales RCCN presentaron un peso corporal con una masa muscular significativamente menor respecto de C durante el periodo experimental. Asimismo, luego de cuatro semanas de restricción, se observó un menor crecimiento global y del fémur, en particular, con un ancho de cartílago en reposo-proliferativo e hipertrófico y un volumen óseo subcondral de tibia de animales desnutridos significativamente menores.

Independientemente de la condición nutricional, no se evidenciaron diferencias significativas en los parámetros mencionados entre los grupos tratados con propranolol en relación con sus respectivos controles, C y RCCN, sugiriendo que el fármaco empleado no produciría efectos *per se* sobre el peso y la

longitud corporal global, el peso muscular y la morfo e histomorfometría óseas. 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-bloqueante.³²

En congruencia con estudios previos realizados en nuestro laboratorio,¹⁵ la resistencia ósea de la media diafisis de ratas RCCN se afectó negativamente respecto de los animales C luego de cuatro semanas de restricción de alimento, resultado de una menor masa ósea cortical con un deterioro de las propiedades geométricas. Dicha respuesta sería la consecuencia de una estimulación mecánica insuficiente por disminución del peso corporal y/o de la actividad muscular, lo que determinaría una pérdida neta de masa ósea como mecanismo de adaptación, con el propósito de disminuir el elevado costo metabólico del mantenimiento de una masa ósea, la que resultaría inadecuadamente excesiva para la actividad del individuo.^{8,9,33}

La menor estimulación mecánica en los animales RCCN determinaría un cambio de la remodelación ósea del modo conservativo al modo desuso, eliminando hueso para ajustar su deformabilidad a la nueva carga a soportar.³¹

Asimismo, en congruencia con estudios previos, se observó que el propranolol en el régimen administrado incrementó el hueso cortical y la eficiencia del diseño arquitectónico con el consiguiente aumento de la competencia mecánica esquelética en las ratas RCCNP.³⁴

Con base a que la eficiencia funcional del mecanostato óseo está determinada por su entorno mecánico^{5,28} y a la importancia del impacto de la unidad funcional músculo-esquelética sobre el desarrollo de la capacidad resistiva ósea,³⁵ los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el propranolol no incrementaría la rigidez ósea en los animales RCCNP por efecto sobre el peso corporal y la masa muscular. Sin embargo, el propranolol ejercería un efecto sobre el estado funcional del mecanostato óseo mediante perturbaciones del entorno endocrino-metabólico reflejadas en cambios de la sensibilidad de las células óseas con la consiguiente modificación de lo que el esqueleto percibe como desuso. El propranolol produciría una ampliación del rango de ajuste biomecánico relativo a la variable sensada, modificaría la percepción de la deformación ósea como señal de error para el sistema y/o las respuestas efectoras de los osteoblastos y osteoclastos en el presente modelo de estrés nutricional.

Desde una perspectiva biomecánica, al comparar las ratas RCCNP con el grupo RCCN, si bien la carga mecánica a soportar por los portantes es la misma, la menor estimulación mecánica respecto de los animales C no sería interpretada como señal de error biomecánico en las ratas RCCNP, lo que resultaría en incorporación modelatoria de hueso en las ratas con restricción de alimento. En efecto, al analizar los marcadores de modelado-remodelado óseos, se evidencia un incremento del remodelado óseo a expensas de un aumento de la resorción sin modificación de la formación en las ratas RCCN respecto a los animales control de igual edad cronológica. Asimismo, la disminución de los niveles séricos de CTX en las ratas desnutridas tratadas con propranolol sugiere que el aumento de la masa ósea en los animales RCCNP sería la consecuencia, al menos en parte, de un efecto del β -bloqueante sobre la resorción ósea, la que disminuye sensiblemente en presencia del fármaco con independencia de la restricción de alimento.

La PTH es la hormona calciotropa de mayor importancia involucrada en la homeostasis del calcio en los mamíferos;³⁶ sumado a su papel sobre el calcio, la PTH también regula la concentración sérica de fosfato mediante la inhibición de la reabsorción tubular renal.^{36,37}

En el presente estudio, si bien a tiempo final no se observan diferencias significativas respecto de los niveles séricos de PTHi, calcio y fósforo de ratas control y experimentales con/sin propranolol, es factible la ocurrencia de posibles modificaciones del entorno endocrino-metabólico en el modelo animal de retraso del crecimiento estudiado.^{38,39}

En efecto, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó que la restricción global, leve y crónica, resultó en retraso puberal con disminución de los niveles séricos de LH, FSH y de testosterona, con un patrón de actividad del sistema neuronal LHRH correspondiente a ratas inmaduras en el presente modelo de estrés nutricional.^{40,41} Asimismo, las ratas RCCN presentaron niveles séricos de STH e IGF-I disminuidos respecto de los animales control, en congruencia con el deterioro del crecimiento global y óseo, en particular, con deterioro de la competencia biomecánica a causa de la restricción de alimento.¹⁵

El perfil endocrino distorsionado de los animales RCCN sería, al menos en parte, responsable de una modificación del mecanismo operacional del mecanostato óseo, en el que la homeostasis mineral se ve privilegiada por sobre el control de la rigidez ósea, con ulterior normalización de los niveles séricos de

la PTH en dichos animales. Esto determinaría el desarrollo de osteopenia con incremento del riesgo de fractura en el presente modelo animal de estrés nutricional.

Mediante la investigación de interrelaciones funcionales entre variables determinantes de las propiedades materiales, geométricas y estructurales óseas, Ferretti propuso nuevos recursos diagnósticos en la fisiopatología ósea, que surgieron del análisis de las curvas distribución/masa ósea y distribución/calidad del material.²⁶

En el presente estudio se observó que las pendientes de las curvas distribución/masa de los animales CP y C no presentaron diferencias significativas, lo que sugiere que el propranolol no interfiere en el control del mecanostato óseo en condiciones de adecuación nutricional.

La pendiente de la curva distribución/masa correspondiente a los animales RCCN es significativamente menor a la del grupo control, lo que sugiere que la eficiencia de la distribución de masa ósea cortical está negativamente afectada en el presente modelo de estrés nutricional. Por el contrario, la administración de propranolol a los animales RCCN resulta en una pendiente significativamente mayor respecto de los animales restringidos sin tratamiento farmacológico, lo que sugiere una interacción positiva del β -bloqueante con los osteocitos, y/o osteoblastos y osteoclastos, con la consiguiente optimización del diseño arquitectónico.

En relación con la curva distribución/calidad del material óseo, en el presente estudio se observó que la correspondiente a los animales RCCN se encontró desplazada hacia abajo y a la izquierda del gráfico respecto de la curva de referencia correspondiente al grupo control. Dicho corrimiento sugiere que la restricción global, leve y crónica resultaría en una interacción catabólica con el control de la calidad ósea por el mecanostato en el presente modelo de estrés nutricional. Este comportamiento es congruente con el aumento del proceso de modelado-remodelado a expensas del incremento de la resorción ósea sin variación de la formación en las ratas RCCN.

El tratamiento de las ratas RCCN con propranolol resulta en un desplazamiento de la curva distribución/calidad hacia arriba y a la derecha de la correspondiente a los animales RCCN, lo que reflejaría una interacción anticatabólica con el punto de referencia del mecanostato óseo. En efecto, la administración de propranolol a ratas RCCN en el régimen descrito, resulta en normalización de los niveles séricos de CTX sin modificación de los niveles de osteocalcina.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio sugieren que el propranolol 7 mg/kg/día permitiría la incorporación modelatoria de hueso con optimización de su diseño arquitectónico, a través de una interacción anticatabólica del β -bloqueante con el mecanismo homeostático de control de la rigidez ósea en el presente modelo animal de retraso del crecimiento. Dicho efecto sería la consecuencia de una modificación de la percepción de la deformación ósea como señal de error mecánico, del punto de referencia biomecánico y/o de la respuesta de los efectores en el presente modelo animal de estrés nutricional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Graciela Champin por su asistencia técnica.

Este trabajo fue subsidiado con fondos de la Universidad de Buenos Aires (Proyectos UBACyT 01/W070).

REFERENCIAS

1. Martin RB. Determinants of the mechanical properties of bones. *J Biomech* 1991; 24: 79-88.
2. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14: 595-608.
3. Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": A proposal. *Anat Rec* 1987; 219: 1-9.
4. Frost HM. The mechanostat: A proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner* 1987; 2: 73-85.
5. Frost HM. Perspectives: A proposed general model of mechanostat (suggestions from a new paradigm). *Anat Rec* 1996; 244: 139-47.
6. Ferretti JL, Cointry 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.
7. Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Frost HM. Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 269-79.
8. Schoenau E, Fricke O. Mechanical influences on bone development in children. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: 27-31.
9. 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.
10. 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.
11. Lifshitz F, Moses N, Cervantes C, Ginsberg L. Nutritional dwarfing in adolescents. *Semin Adolesc Med* 1987; 3: 255-66.
12. Lifshitz F, Moses N. Growth, dieting and fear of obesity. *J Am Coll Nutr* 1988; 7: 367-76.
13. Lifshitz F, Moses N. Growth failure: a complication of dietary treatment of hypercholesterolemia. *Am J Dis Child* 1989; 143: 537-42.
14. Friedman SM, Rodriguez PN, Olivera MI, Bozzini C, Norese F, Gamba CA, et al. Enanismo por desnutrición: Cronodinamia de los procesos metabólicos en ratas. *Medicina (B Aires)* 1998; 58: 282-6.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Ferretti JL, Capozza R, Cointry 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.
19. 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.
20. Compagnucci G, Compagnucci C, Olivera M, Roig M, Bozzini C, Boyer P, Alippi R. 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.
21. Compagnucci GE, Compagnucci CV, Olivera MI, Roig MC, Mandalunis P, Morgazo C, Hope S, 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.
22. 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.
23. National Institutes of Health. Laboratory animal welfare: Public Health Service policy on humane care and use of laboratory animals by awardee institutions. 1985, revised 1990.
24. Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 920.105, Ed 1990.
25. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the AS-BMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987; 6: 595-610.
26. Sokal R, Rohlf J. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. 3rd Ed. New York: Freeman; 1995.
27. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 230-6.
28. Frost HM. Introduction to a new skeletal physiology. Pueblo, Colorado, USA: Pájaro Group Editors; 1995.
29. Turner CH. Determinants of skeletal fragility and bone quality. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002; 2: 527-8.
30. Cointry GR, Capozza RF, Ferretti JL, Frost HM. Toward an anthropometric diagnosis of osteopenia and a biochemical diagnosis of osteoporoses. *Medicina (B Aires)* 2003; 63: 737-47.
31. Skerry TM. The response of bone to mechanical loading and disuse: fundamental principles and influences on osteoblast/osteocyte homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 117-23.

32. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002; 111: 305-17.
33. Smith EL, Gilligan C. Mechanical forces and Bone. In: Bone and Mineral Research, Vol. 6. Peck WA (Ed.). Amsterdam: El-sevier; 1989, p. 139-73.
34. Lezón CE, Pintos PM, Olivera MI, Bozzini C, Boyer PM. Effect of different propranolol doses on skeletal structural and mechanic efficiency in an animal model of growth retardation. *Endocrinol Nutr* 2012; 59: 9-20.
35. Schoenau E. From mechanostat theory to development of the "Functional Muscle-Bone-Unit". *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 2005; 3: 232-8.
36. Gensure RC, Gardella TJ, Juppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 666-78.
37. Bacic D, Lehrer M, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner CA. The renal NaC/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone. *Kidney International* 2006; 69: 495-503.
38. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004; 25: 389-425.
39. Karsenty G. Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. *C R Biol* 2011; 334: 720-4.
40. Compagnucci CV, Compagnucci GE, Lomniczi A, Mohn C, Vacas I, Cebral E, Elverdin JC, et al. Effect of nutritional stress on hypothalmo-pituitary-gonadal axis in the growing male rat. *Neuroimmunomodulation* 2002-03; 10: 153-62.
41. Compagnucci CV, Compagnucci GE, Lezón CE, Chiarenza AP, Elverdin JC, Boyer PM. Neuronal LHRH system activity in an animal model of growth retardation. *Endocrinol Nutr* 2010; 57: 187-95.

Reimpresos:

Patricia M. Boyer

Cátedra de Fisiología

Facultad de Odontología

Universidad de Buenos Aires.

M.T. Alvear 2142, 3 A. Capital Federal
C1122AAH

Correo electrónico: pboyer@fisiolodon.uba.ar

Recibido el 31 de mayo 2012.

Aceptado el 28 de septiembre 2012.