

Evaluación densitométrica del tratamiento con hormonas sustitutivas y alendronato en la osteoporosis experimental en ratas*

Brem, J.J.¹; Trulls, H.E.¹; Lanari Zubiaur, A.E.²;
Picot, J.A.¹; Brem, J.C.¹; Ortíz de Rus, M.L.¹

¹Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139 Corrientes (3400), Argentina. Tel 03783-430101. E-mail: fisbiol@vet.unne.edu.ar ²Cátedra de Diagnóstico por Imágenes de la Facultad de Medicina-UNNE.

Resumen

Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Lanari Zubiaur, A.E.; Picot, J.A.; Brem, J.C.; Ortíz de Rus, M.L.: Evaluación densitométrica del tratamiento con hormonas sustitutivas y alendronato en la osteoporosis experimental en ratas. Rev. vet. 18: 2, 78–83, 2007. El tratamiento de la osteoporosis (OP) es preventivo pues solo se dispone de fármacos antirresortivos, tales como los bifosfonatos, careciéndose de verdaderas drogas osteoformadoras. Las medidas preventivas están dirigidas a alcanzar mayor masa ósea durante el crecimiento, evitar pérdidas en OP ya establecidas y disminuir el riesgo de fracturas cuando la masa ósea esté disminuida. El alendronato, como otros bisfosfonatos, inhibe la actividad de osteoclastos y por ende la resorción ósea. Como los estrógenos y progesterona son importantes para mantener el hueso, se los prescribe como terapia de reemplazo hormonal en mujeres posmenopáusicas. Se realizaron ensayos de 8 meses de duración con 48 ratas hembras cepa Wistar, de 4 meses de edad, conformándose un lote ovariectomizado (OV, n= 36) y otro testigo (n=12) con cirugía simulada (maniobra quirúrgica sin ovariectomía). A los 3 meses, los OV fueron separados en 3 lotes de 12 ratas cada uno (OV sin tratamiento, OV tratados con alendronato y OV con hormonas). El objetivo fue evaluar la terapia con alendronato (en dosis semanales de 0,27 mg/animal, durante 5 meses, vía oral) en forma comparativa a la de estrógeno-progesterona (durante 5 meses vía SC en dosis mensuales de 250 ug de benzoato de estradiol y 6,25 mg de caproato de hidroxiprogesterona). Las evaluaciones de concentración mineral ósea (CMO) y densidad mineral ósea (DMO) se efectuaron por densitometría dual de rayos X (DXA), realizada mediante un software especial para pequeños animales. El tratamiento hormonal produjo efectos benéficos significativos en DMO y CMO de las regiones espinal lumbosacra ($p<0,001$) y coxofemoral ($p<0,0001$) respecto a OV sin tratamiento. El alendronato solo obtuvo diferencias significativas en CMO de región coxofemoral. Se concluye que en el modelo experimental de OP, la respuesta al tratamiento con estrógeno-progesterona fue más eficiente que la obtenida con alendronato, al lograr mantener DMO y CMO similares a las de los testigos.

Palabras clave: rata, castración, osteoporosis, alendronato, hormonoterapia, densitometría, concentración mineral.

Abstract

Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Lanari Zubiaur, A.E.; Picot, J.A.; Brem, J.C.; Ortíz de Rus, M.L.: Densitometric evaluation of treatments with substitutive hormones and alendronate in the rat experimental osteoporosis. Rev. vet. 18: 2, 78–83, 2007. Treatment of osteoporosis (OP) is only of a preventive kind. No real tissue-forming drugs exist, and only antiresorptive agents are available (biphosphonates). Prevention of OP consists in: reach an important bone mass during growth, avoid lacks in OP, and decrease the risk of fractures in subjects with an important decrease of osseous mass. Alendronate inhibits the activity of osteoclasts, and therefore osseous resorption. Because estrogens and progesterone are important to maintain bone structure, they are prescribed as replacement therapy in menopausal woman. Assays with 48 female Wistar rats, 4 months-old, were carried out for 8 months. Rats were grouped in two lots: ovariectomized (OV, n=36) and controls (n= 12), with a simulated surgery (surgical procedure without ovariectomy). After 3 months, OV group was divided into 3 lots, 12 rats each (OV without treatment, OV treated with alendronate and OV treated with hormones). Purpose of this work was to evaluate an alendronate therapy (oral doses of

0.27 mg/animal/week, during 5 months), in contrast to an estrogens-progesterone treatment (5 months, 250 ug SC estradiol benzoate and 6.25 mg hydroxyprogesterone caproate), and to evaluate bone mineral concentration (BMC) and bone mineral density (BMD) by X-rays dual densitometry (DXA). From the studied corporal regions, significant effects of hormones in BMC and BMD of lumbosacra spine region ($p < 0,001$) and coxofemorale region ($p < 0,0001$), were observed. Regarding OV without treatment, therapy with alendronate presented a BMC with significant differences but only in the coxofemorale region. It is concluded that in the experimental model of OP, response to treatment with estrogens and progesterone was more efficient compared to alendronate, considering the capacity to maintain BMC and BMD similar to controls.

Key words: rat, castration, osteoporosis, alendronate, hormone therapy, densitometry, mineral concentration.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis (OP) es un desorden esquelético caracterizado por disminución de la masa y resistencia ósea por deterioro de su microarquitectura, incrementándose así el riesgo de fracturas frente a cargas de baja intensidad. Sin un adecuado tratamiento y medidas preventivas, la OP progresa de manera silenciosa y casi siempre indolora hasta la fractura de algún hueso, especialmente cadera, columna vertebral y muñecas, provocando un menoscabo de la calidad de vida y pérdida de independencia personal del individuo². En las mujeres la OP es de tipo I y está relacionada a factores hormonales, desarrollando la enfermedad con una frecuencia cuatro veces más alta que los hombres; en éstos se la considera como una OP de tipo II por factores relacionados a la edad. Es importante destacar que el hueso es un tejido con actividad dinámica de formación colágena y posterior mineralización; en su desarrollo y mantenimiento están involucrados procesos muy complejos que incluyen crecimiento endocondral, modelación y remodelación^{9,13}. El hueso es un tejido vivo con crecimiento y modificaciones permanentes, que se renueva a través de un proceso de remoción del material viejo por una continua actividad osteoclástica y reemplazo por hueso nuevo por acción osteoblástica. En etapas tempranas de la vida se forma más hueso del que es removido, alcanzándose la mayor densidad y resistencia ósea en la adolescencia, luego viene una etapa de estabilidad, a partir de la cual el hueso viejo se remueve con una velocidad mayor que con la que puede ser reemplazado, conduciendo a una pérdida de la densidad ósea por disminución del contenido mineral²².

Considerando la fisiopatología de la OP, y en especial la posmenopáusia, el hecho más relevante es que el déficit hormonal provoca un incremento en la pérdida de hueso, ya que los ovarios producen menos estrógenos y progesterona. Los efectos de la deficiencia estrogénica son complejos, destacándose los que suceden a nivel del remodelado óseo ya que aparece un aumento de la frecuencia de activación de sitios nuevos de remodelación en el hueso esponjoso y cortical³⁰. Los estrógenos tienen un papel muy importante en

el mantenimiento de densidad de los huesos y su falta hace que su pérdida se vuelva excesiva. En términos generales, una vez que el hueso se ha perdido es difícil que pueda ser reemplazado y consecuentemente se hace cada vez más frágil y susceptible de romperse.

El alendronato, como otros bisfosfonatos, inhibe la actividad de los osteoclastos y la resorción ósea. Al unirse a las sales de calcio, el alendronato bloquea la transformación de fosfato cálcico a hidroxapatita y, por lo tanto, inhibe la formación, agregación y disolución de estos cristales en el hueso. No se conoce bien el mecanismo molecular por el cual los bisfosfonatos inhiben esta resorción; algunos sostienen que el alendronato se localiza preferentemente en los sitios donde hay resorción pero no interfiere con el reclutamiento y fijación de los osteoclastos. Otros en cambio, demostraron que los bisfosfonatos, y muy especialmente el alendronato, suprimen la resorción ósea por favorecer la apoptosis de osteoclastos y hasta podrían incrementar la masa ósea estimulando la diferenciación y maduración de precursores de osteoblastos^{1,34}. La eficacia antiresortiva de los diferentes bisfosfonatos radica en su cadena lateral que parte del átomo de carbono¹⁴. Esta acción es aprovechada para realizar tratamientos de enfermedades con elevado remodelamiento óseo, como la enfermedad de Paget³⁷, hipercalcemia del cáncer³³, enfermedad metastásica ósea¹⁹ y osteoporosis^{4,7}. Se ha demostrado que los bisfosfonatos suprimen la resorción ósea por favorecer la apoptosis de osteoclastos^{32,34} e inhibir su diferenciación durante el proceso de maduración²⁶. Por otro lado, la supresión del remodelamiento óseo por uso prolongado de bisfosfonatos puede llegar a alterar ciertas propiedades biomecánicas, tal como fue demostrado en perros²⁸.

Uno de los problemas actuales es realizar no solo un correcto diagnóstico para su detección, sino también un adecuado seguimiento de la respuesta al tratamiento instaurado. La OMS (World Health Organization) ha categorizado el diagnóstico en base a la cuantificación de la densidad mineral ósea (DMO) y contenido mineral óseo (CMO) realizada mediante densitometría. Otros en cambio cuestionan este método aduciendo falta de sensibilidad de la densitometría dual por rayos X

(DXA), a pesar de su amplia difusión en el diagnóstico humano de osteoporosis, sosteniendo que esta técnica solo tiene un valor indicativo osteológico que no va más allá de la confirmación de una osteopenia, porque realiza una absorciometría de proyección de estructuras volumétricas óseas en solo dos dimensiones y no valora su verdadera resistencia^{12, 13}.

De cualquier manera, la DXA es cada vez más utilizada en las investigaciones animales, habiéndose encontrado correlaciones muy significativas de este método con lesiones histológicas e histomorfométricas⁸ y con el análisis químico del contenido mineral del hueso o cenizas³⁵. Otros investigadores incluso encontraron una muy buena correlación entre dos instrumentos distintos de DXA²⁷. La absorciometría de rayos X de doble energía realizado mediante un software especial para pequeños animales es una excelente técnica para medir la DMO en ratas^{16, 20}, aunque se recomiendan distintas condiciones de trabajo del equipo para cada zona del cuerpo en particular, a diferencia de la utilizada para cuerpo entero.

Se ha demostrado la utilidad de la DXA realizada mediante un software especial para pequeños animales en modelos experimentales en investigaciones de trastornos óseos. El hueso de la rata ha sido tomado como modelo experimental de OP y de otras osteopatías porque el proceso de remodelación ósea ocurre durante toda la vida y no solo hacia el final, como en la mayoría de los animales²⁹.

En el presente trabajo se eligió este modelo experimental debido a que algunas investigaciones afirman que la rata ovariectomizada sería el mejor modelo experimental de OP humana postmenopáusica⁵. Estudios histológicos en ratas ovariectomizadas mostraron disminuciones marcadas del volumen óseo y espesor de laminillas⁶.

El objetivo del ensayo fue evaluar la terapia con alendronato en forma comparativa a la de estrógeno-progesterona en este modelo experimental de osteoporosis a través del comportamiento de la densidad mineral ósea y de la concentración mineral ósea obtenidas mediante densitometría dual por rayos X.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo de 8 meses con 48 ratas hembras de la cepa Wistar de 4 meses de edad, conformándose un lote castrado (ovariectomizados OV, n=36) y otro testigo (n=12) con simulacro de ovariectomía (maniobra quirúrgica sin extirpación de ovarios). A los 3 meses de la cirugía los OV fueron separados en 3 lotes de 12 animales cada uno (OV sin tratamiento, OV tratados con alendronato y OV dosificados con hormonas). El alendronato fue administrado una vez por semana en dosis de 0,27 mg/animal, durante 5 meses por vía oral, vehiculizado en el agua de bebida, con ayuno previo de sólidos por 24 horas y de agua por 12 horas, volviendo a su dieta normal recién a las 8 horas post-medicación. Los tratados con hormonas recibieron durante 5 meses por vía subcutánea una dosis mensual de 250 ug de benzoato de estradiol y 6,25 mg de caproato de hidroxiprogesterona por animal.

Las densitometrías se realizaron sobre cuerpo entero y algunas regiones predeterminadas (Figura 1), promediándose los resultados obtenidos para las zonas coxofemoral y femorotibial izquierda y derecha de cada animal. Las determinaciones del contenido mineral óseo (CMO), expresadas en mg, y densidad mineral ósea (DMO), expresadas en mg/cm², fueron realizadas hacia el final del ensayo en 6 animales de cada lote. Los estudios se efectuaron con un densitómetro dual de rayos X marca Hologic, modelo QDR, versión 2000 plus, calibrado con una intensidad de 300 mA y una ventana de muestreo de 1,7 a 3,3 mm, con un software especial para pequeños animales. Para este estudio, las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal con hidrato de cloral a dosis de 300 mg/kg acompañado de un antibiótico para prevenir posibles infecciones.

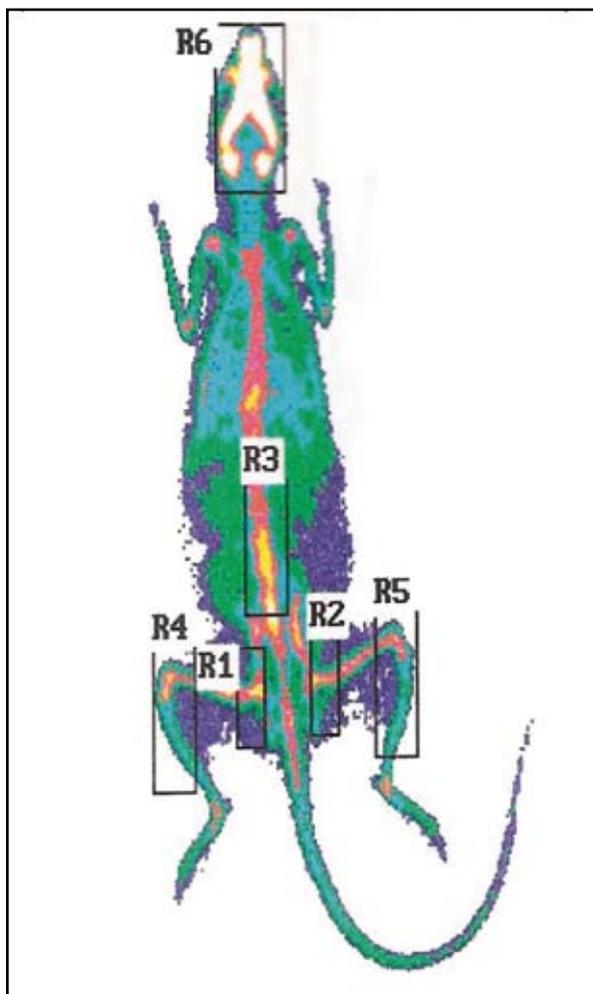


Figura 1. Regiones predeterminadas para la realización de las densitometrías. R1 y R2: coxofemoral derecha e izquierda; R4 y R5: femorotibial derecha e izquierda; R3: espina lumbosacra; R6: cabeza. También se registraron valores de cuerpo entero.

En el análisis estadístico, CMO y DMO fueron tratados por análisis de la variancia (ANOVA) para un diseño completo al azar a un criterio de selección, utilizándose un $\alpha = 5\%$ para rechazar la hipótesis nula. Los cálculos se efectuaron con el auxilio del software Sta-

Tabla 1. Densidad mineral ósea-DMO (mg/cm²) de las diferentes regiones, expresados en promedio y desvío estándar en los cuatro lotes de ratas al final del ensayo.

región corporal	testigos simulacro (n=6)	ovariectomizadas sin tratamiento (n=6)	ovariectomizadas + alendronato (n=6)	ovariectomizadas + hormonas (n=6)
coxofemoral (*)	0,1239 ± 0,005 a	0,1101 ± 0,004 b	0,1156 ± 0,005 b	0,1233 ± 0,004 a
femorotibial	0,0810 ± 0,005	0,0743 ± 0,003	0,1359 ± 0,009	0,0852 ± 0,002
lumbosacra (**)	0,1391 ± 0,010 a	0,1213 ± 0,004 b	0,1312 ± 0,008 b	0,1516 ± 0,005 a
cabeza	0,2314 ± 0,006	0,1937 ± 0,079	0,2397 ± 0,007	0,2355 ± 0,004
cuerpo total	0,1238 ± 0,015	0,1115 ± 0,002	0,1150 ± 0,003	0,1218 ± 0,002

(*) y (**) = $p < 0,0001$. En cada fila, letras iguales tienen comportamiento similar y letras distintas son significativamente diferentes.

Tabla 2. Concentración mineral ósea (CMO en mg) de las diferentes regiones, expresadas en promedio y desvío estándar en los cuatro lotes de ratas al final del ensayo.

región corporal	testigos simulacro (n=6)	ovariectomizadas sin tratamiento (n=6)	ovariectomizadas + alendronato (n=6)	ovariectomizadas + hormonas (n=6)
coxofemoral (*)	0,1471 ± 0,012 a	0,1247 ± 0,015 b	0,1411 ± 0,015 a	0,1513 ± 0,008 a
femorotibial	0,1765 ± 0,024	0,1707 ± 0,009	0,1725 ± 0,018	0,1823 ± 0,011
lumbosacra (**)	0,5178 ± 0,058 a	0,4294 ± 0,043 b	0,5284 ± 0,095 b	0,6146 ± 0,095 a
cabeza	1,7173 ± 0,043	1,7486 ± 0,029	1,8080 ± 0,057	1,7135 ± 0,050
cuerpo entero	5,2868 ± 0,299	5,3977 ± 0,234	5,3203 ± 0,163	5,3418 ± 0,1714

(*) = $p < 0,0002$ y (**) = $p < 0,01$. En cada fila, letras iguales tienen comportamiento similar y letras distintas son significativamente diferentes.

tistix 3.5, 1991. Antes de cada análisis, los datos fueron confrontados para verificar su distribución normal (test de Shapiro-Wilk y gráfica de ranking de las muestras), homogeneidad de las variancias (test de Bartlett) e independencia (mediante la aleatorización de las unidades experimentales). La comparación de medias con riesgo alfa = 5% se realizó mediante el test de Scheffé, que controla la razón del error por experimento.

RESULTADOS

Los valores de DMO, similares entre los lotes castrados con y sin alendronato, fueron diferentes a los obtenidos en testigos y castrados con hormonas (Tabla 1). El efecto beneficioso de estrógeno y progesterona se evidenció por los aumentos significativos de DMO a nivel de las regiones lumbosacra ($p < 0,001$) y coxofemoral ($p < 0,0001$), con valores semejantes a los del lote testigo. No existieron cambios de DMO en el resto de las regiones estudiadas.

Con alendronato, la CMO arrojó diferencias significativas respecto a castrados sin tratamiento solo en la región coxofemoral. En cambio, con el tratamiento hormonal este parámetro se vio beneficiado con diferencias significativas no solo en esta región sino también en la lumbosacra respecto a testigos (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Los valores similares de DMO entre grupos castrados y tratados con alendronato se contraponen con lo observado por algunos autores con el uso de otro bifosfonato⁴². La pérdida de DMO en la depleción es-

trogénica por una menopausia provocada^{31,38} o natural⁴⁰ es debida a un aumento en la pérdida de hueso por incremento de la remodelación ósea, donde la resorción excede a la formación.

El tratamiento con estrógenos en ratas OV aumentó la eliminación de calcio por orina, en contraposición a lo encontrado en mujeres menopáusicas^{10,24}; otros en cambio observaron una mayor calciuria en ratas con simulacro de castración, respecto a las verdaderamente ovariectomizadas²³. La deficiencia de estrógenos también provoca una disminución de la tasa de absorción intestinal de calcio³. Asimismo, pudo observarse que ratas OV tuvieron mayor actividad de fosfatasa alcalina respecto a los controles y a las OV tratadas con estrógenos a los 3 y 6 meses de comenzado el ensayo; esto indica que el estrógeno contrarresta el efecto negativo de la ovariectomía, normalizando la remodelación del hueso cuya resorción estaba incrementada por déficit de la hormona^{17,18,39}. Este efecto ha sido corroborado en ratas mediante un analizador de imágenes donde se observó un mantenimiento del espesor trabecular tibial en ejemplares OV tratados con estrógeno-progesterona⁶.

Los valores de CMO fueron coincidentes con los datos obtenidos por densitometría⁵. Otros en cambio registraron disminuciones de DMO y CMO en ratas hembras con retroversión uterina²⁵; también ocurrió esto en algunos estudios efectuados sobre el CMO de ratas ovariectomizadas y ratas machos tratadas con parathormona. Otros autores encontraron que el grado de osteopenia en ratas ocasionado por la ovariectomía no guardaba relación con el nivel de calcio de la dieta ni con la eficacia en la absorción intestinal de calcio²¹;

también son diferentes a otros que evaluaron los efectos sobre el CMO en la restricción alimentaria y adicción de calorías con diferentes cantidades de grasa en ratas de edad avanzada³⁶.

En el presente trabajo se registraron diferentes grados de acción osteopélica, según las regiones consideradas en los estudios densitométricos, lo cual puede estar relacionado al tejido óseo trabecular predominante a nivel de las regiones lumbosacra y femorotibial, tal como fuera reportado por otros⁴². Se han observado rápidas pérdidas de hueso trabecular luego de la depleción estrogénica en ratas ovariectomizadas^{41, 42}. Esto es concordante con estudios clínicos que sugieren que en las etapas iniciales de la menopausia existiría una mayor sensibilidad del hueso trabecular a la deficiencia estrogénica¹¹. Las razones por las cuales el hueso cortical es aparentemente resistente a perder masa ósea por déficit estrogénico no están muy claras, pero algunos sugieren que los cambios osteopélicos a nivel de la tibia proximal se incrementan debido a la elevada velocidad basal de remodelamiento óseo que tiene lugar en esta región⁴¹. No se han registrado aquí alteraciones densitométricas en la masa total del cuerpo; ello puede ser debido a que el hueso trabecular solo aporta el 20% del esqueleto total¹⁵.

Se concluye que el alendronato, en la dosis y frecuencia utilizadas en el tratamiento de OP en nuestro modelo experimental, no resultó tan eficiente como el tratamiento hormonal, el cual logró mantener la densidad mineral ósea y la concentración mineral ósea a niveles similares a los de los testigos.

Agradecimientos. A la Lic. María Emilia García Denegri por la redacción del abstract.

REFERENCIAS

1. Abe Y, Kawakami A, Nakashima T, Ejima E, Fujiyama K, Kiriya T, Ide A, Sera N, Usa T, Tominaga T, Ashizawa K, Yokoyama N, Eguchi K. 2000. Etidronate inhibits human osteoblast apoptosis by inhibition of proapoptotic factor(s) produced by activated T cells. *J Lab Clin Med* 136: 344-354.
2. Barret-Connor E. 1995. The economics and human cost of osteoporotic fracture. *Am J Med* 98: 3-8.
3. Blanus M, Matkovic V, Kostial K. 1978. Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. *Pflugers Arch* 375: 239-244.
4. Bone HG, Hosking D, Devoelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, Rodríguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA. 2004. Alendronate phase III: osteoporosis treatment study group. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 350: 1189-1199.
5. Brem JJ, Trulls HE, Lanari Zubiaur AE, Ortíz de Rus ML, Pochón DO, Picot JA, Brem JC. 2004. Osteoporosis experimental en ratas ovariectomizadas: densitometría ósea y concentración de minerales en sangre y cenizas de hueso. *Rev Vet* 15: 56-61.
6. Brem JJ, Trulls HE, Picot JA, Ortíz de Rus ME, Lorente JA, Ortega HH, Brem JC. 2005. Respuesta del tejido trabecular óseo y concentración de minerales a la terapia hormonal de reemplazo en ratas ovariectomizadas. *Rev Vet* 16: 69-73.
7. Burr DB, Miller L, Grynpas M, Li J, Boyde A, Mashiba T, Hirano T, Johnston CC. 2003. Tissue mineralization is increased following 1-year treatment with high doses of bisphosphonates in dogs. *Bone* 33: 960-969.
8. Campodarve YO, Diez UN, Puig J, Serrano S, Marino ML, Arnau MD, Curcurull J, Ibáñez J, Nogues X, Aubia J. 1993. Correlation between densitometric and histomorphometric values in isolated vertebrae of Sprague-Dawley rats. *Calcif Tissue Int* 52: 470-471.
9. Chiappe Barbará MA. 2004. Mecanismos reguladores de la biología ósea, su importancia en la patogénesis de las osteopatías fragilizantes. *Rev Med Vet* 85: 8-15.
10. Christiansen C, Christensen MS, Larsen ME, Transbol I. 1982. Pathophysiological mechanisms of estrogen effect on bone metabolism. Dose-response relationships in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 55: 1124-1130.
11. Diamont T, Nevy I, Hales I. 1991. A therapeutic dilemma: suppressive doses of thyroxine significantly reduce bone mineral measurements in both premenopausal and postmenopausal women with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 1184-1188.
12. Ferreti JL, Capozza RF, Zanchetta JR. 1996. Mechanical validation of a tomographic (pQTC) index for the noninvasive measurement of rat femur bending strength. *Bone* 18: 97-102.
13. Ferreti JL. 1997. Biomechanical properties of bone. In: *Osteoporosis and Bone Densitometry* (Genant HK, Giggliemi G, Jergas M Ed.), Springer-Verlag, Berlin.
14. Fleish H. 1998. Bisphosphonates: mechanism of action. *Endocrin Rev* 19: 80-100.
15. Frost HM, Jee WS. 1992. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18: 227-236.
16. Gala Paniagua J, Diaz Curiel M, De la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo García M. 1998. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 71: 754-758.
17. García Moreno C, Calvo OM, Herrero S, Martín E, Suquía B, San Román JI, Martín M, García Talavera JR, Calvo JJ, Del Pino J. 1995. Heterogeneous decrease of bone mineral density in the vertebral column of ovariectomized rats. *Bone* 16: 2955-3005.
18. Garner Sanford C, Anderson JB, Mar M, Parikh I. 1991. Estrogen reduce bone loss in the ovariectomized lactating rat model. *Bone Min* 15: 19-31.
19. Hillner BE, Ingle JN, Berenson JR, Janjan NA, Albain KS, Lipton A, Yee G, Biermann JS, Chlebowski RT, Pfister DG. 2000. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonate in breast cancer. *J Clin Oncol* 18: 1378-1391.
20. Ito M, Hayashi K, Ito M. 1990. Quantitative evaluation of bone mineral density of rat femur by using DEXA (dual energy X-ray absorptiometry). *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 50: 1150-1152.

21. **Kalu DN, Orhii PB.** 1999. Calcium absorption and bone loss in ovariectomized rats fed varying levels of dietary calcium. *Calcif Tissue Int* 65: 73-77.
22. **Kelly PJ, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA.** 1989. Age and menopause-related changes in indices of bone turnover. *Endocrinol Metab Clin NA* 69: 1160-1165.
23. **Koppo K, Hannuniemi R, Virtamo T, Lauren L, Ika-
valko H, Kovanen V, Osterman T, Sellman R.** 1995. The effects of clodronate on increased bone turnover and bone loss due to ovariectomy in rats. *Bone* 17: 533-542.
24. **Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, MacDonald EB, Anderson JB, Clarke AC.** 1976. Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. *Lancet* I: 1038-1041.
25. **López Castejon A, Revilla M, Hernández ER, Villa IF, Rico H, Cortés J.** 1999. Effect of induced uterine retroversion on bone mass in rats. *Eur J Obstet Gineco Reprod Biol* 83: 101-104.
26. **Lowick CW, Boonekamp PM, Van de Pluym G.** 1986. Bisphosphonate can reduce osteoclastic bone resorption by two different mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 208: 271-281.
27. **Makan S, Bayley HS, Webber CE.** 1997. Precision and accuracy of total body bone mass and body composition measurements in the rat using X-ray based dual photon absorptiometry. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 1257-1261.
28. **Mashiba T, Hirano H, Turner CH.** 2000. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage, accumulation and reduces some biochemical properties in dog ribs. *J Bone Min Res* 15: 613-620.
29. **Moschinsky E, Schubert R, Kohler S, Madry M, Reichelf H.** 1991. The dynamics of bone apposition in different animal species. A comparative study. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 79: 269-277.
30. **Recker RR, Kimmel DB, Parfitt AM.** 1988. Static and tetracycline-based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females. *J Bone Miner Res* 3: 133-144.
31. **Reeve J.** 1987. Bone turnover and trabecular plate survival after artificial menopause. *Br Med J Clin Res* 295: 757-760.
32. **Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA.** 1999. Bisphosphonate acts directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of MST-1-kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem* 274: 349-367.
33. **Rizzoli R, Thiebaud D, Bundred N, Pecherstorfer M, Herrmann Z, Huss HJ, Ruckert F, Manegold C, Tubiana-Hulin M, Steinhauer EU, Degardin M, Thurlimann B, Clemens MR, Eghbali H, Body JJ.** 1999. Serum parathyroid hormone-related protein levels and response to bisphosphonate treatment in hypercalcemia of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3545-3550.
34. **Rodan GA, Fleish HA.** 1996. Bisphosphonates: mechanism of action. *J Clin Invest* 97: 2692-2696.
35. **Rose BS, Flatt WP, Martin RJ, Lewis RD.** 1998. Whole body composition of rats determined by dual energy X-ray absorptiometry is correlated with chemical analysis. *J Nutr* 128: 246-250.
36. **Sanderson JP, Binkley N, Roecker EB, Champ JE, Pugh TD, Aspnes I, Weindruch R.** 1997. Influence of fat intake and caloric restriction on bone in aging male rats. *J Gerontol A Biol Sci Med* 52: B20-25.
37. **Siris SE, Chines AA, Altman RD, Brown JP, Johnston CC, Lang R, McClung MR, Mallette LE, Miller PD, Ryan WG, Singer FR, Tucci JR, Eusebio RA, Bekker PJ.** 1998. Risedronate in the treatment of Paget's disease of bone: an open label, multicenter study. *J Bone Min Res* 13: 1032-1038.
38. **Stepan JJ, Pospichal J, Schreiber V, Kanka J, Mensik J, Presl J.** 1989. The application of plasma tartrate-resistant acid phosphatase to assess changes in bone resorption in response to artificial menopause and its treatment with estrogen or norethisterone. *Calcif Tissue Int* 45: 273-280.
39. **Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH.** 1987. The effects of ovariectomy and 17-B estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Min Res* 2: 115-122.
40. **Uebelhart D, Schlemmer A, Johansen JS, Bineyts E, Christiansen C, Delmas PD.** 1991. Effect of menopause replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 367-373.
41. **Wronski TJ, Dann LM, Horner SL.** 1989. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 10: 295-301.
42. **Zeni SN, Gomez-Acotro C, Di Gregorio S.** 1998. El olpadronato previene la pérdida de hueso cortical y trabecular inducida por dosis suprafisiológicas de tiroxina en ratas ovariectomizadas. *Medicina* 58: 453-457.