

Respuesta del tejido trabecular óseo y la concentración de minerales a la terapia hormonal de reemplazo en ratas ovariectomizadas*

Brem, J.J.¹; Trulls, H.E.¹; Picot, J.A.¹; Ortiz de Rus, M.E.¹;
Lorente, J.A.²; Ortega, H.H.²; Brem, J.C.¹

¹Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel/Fax 03783-430101, E-mail: fisbiol@vet.unne.edu.ar

²Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Luis Kreder 2805, Esperanza (3080), Santa Fe, Argentina.

Resumen

Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Picot, J.A.; Ortíz de Rus, M.E.; Lorente, J.A.; Ortega, H.H.; Brem, J.C.: Respuesta del tejido trabecular óseo y la concentración de minerales a la terapia hormonal de reemplazo en ratas ovariectomizadas. Rev. vet. 16: 2, 69-73, 2005.

La ausencia o disminución de estrógenos y progesterona causan pérdida de masa ósea. En la osteoporosis posmenopáusica aumenta la fragilidad esquelética por disminución de la resistencia biomecánica del hueso frente al desafío de cargas deformantes de escasa intensidad, situación que en la mujer exige terapia hormonal. El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos de la terapia con estrógenos y progesterona sobre el tejido trabecular tibial de ratas ovariectomizadas, así como registrar en sangre y huesos el comportamiento de analitos relacionados al metabolismo óseo. Se usaron 45 ratas Wistar de 4 meses de edad, agrupadas en lotes castrado (n = 24) y control (n = 21). El ensayo duró 19 meses. Seis meses antes de finalizar, la mitad de los animales ovariectomizados recibieron 5 dosis mensuales de 250 ug de benzoato de estradiol y 6,25 mg de caproato de hidroxiprogesterona via SC. A los 30 días de culminado el tratamiento las ratas fueron sacrificadas, extrayéndose muestras de sangre y hueso. La histomorfometría mostró una buena recuperación del espesor trabecular en la metáfisis tibial de los animales tratados con hormonas, cuyos parámetros resultaron similares a los testigos ($43,47 \pm 2,87$ y $43,09 \pm 7,49$ um respectivamente). En cambio, en el resto de los animales castrados el espesor trabecular permaneció disminuido ($30,93 \pm 5,25$ um, $p < 0,05$). El contenido mineral del hueso no registró variaciones significativas entre lotes, pero en sangre se verificaron disminuciones significativas de magnesio en ambos lotes castrados, así como de fosfatasa alcalina en los tratados hormonalmente. Se concluye que a pesar del tratamiento tardío realizado, se logró mantener el espesor de las trabéculas óseas del tejido esponjoso tibial en ratas ovariectomizadas.

Palabras clave: rata, ovariectomía, osteoporosis, tratamiento hormonal, estrógeno, progesterona.

Abstract

Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Picot, J.A.; Ortíz de Rus, M.E.; Lorente, J.A.; Ortega, H.H.; Brem, J.C.: Response of trabecular bone tissue and mineral concentration to hormonal replacement therapy in ovariectomized rats. Rev. vet. 16: 2, 69-73, 2005. Lack or decrease of estrogen and progesterone production may lead to loss of osseous tissue. Skeletal fragility increases in postmenopausal osteoporosis because the bone biomechanic resistance decrease, this being evident when it is submitted to deforming loads of scarce intensity; the latter condition in postmenopausal woman makes hormonal replacement therapy necessary. The aim of this study was to determine the effects of a therapy based on estrogen and progesterone administration, on tibial spongiouse tissue in ovariectomized rats, as well as to observe the behavior of blood and osseous analytes related to bone metabolism. Female Wistar rats, 4 months-old, were used. They were divided into lots of 24 castrated animals and 21 non-castrated controls. The test last 19 months. Six months before the end of the experiment, half of the ovariectomized rats received five SC doses of 250 ug benzoate of estradiol and 6.25 mg of caproate of hydroxyprogesterone, once a month. Thirty days after the end of treatments, rats were euthanized, and blood and osseous tissue samples were taken for laboratory studies. Histomorphometry revealed a good recuperation of spongiouse density at

tibial metaphysis from castrated animals, which received the hormonal treatment; data were similar in controls (43.47 ± 2.87 μm and 43.09 ± 7.49 μm , respectively). On the contrary, an important decrease of density was observed in castrated females without treatment (30.93 ± 5.25 μm , $p < 0.05$). Blood analyses showed a significant decrease for magnesium in both castrated lots, regarding to controls, and alkaline phosphatase only in those castrated that received hormonal treatment. The chemical analyses performed on bone tissue did not show mineral parameter differences among lots. In conclusion, despite the estrogen–progesterone treatment performed lately, maintenance of cancellous bone density from tibial spongiose tissue in ovariectomized rats was achieved.

Key words: rat, ovariectomy, osteoporosis, hormonal treatment, estrogen, progesterone.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis (OP) es una enfermedad considerada como una osteopenia de tipo fragilizante, donde las alteraciones de la microestructura ósea provocan una disminución de la resistencia biomecánica ante el desafío de cargas de escasa magnitud. En la mujer menopáusica se observa un aumento en la pérdida de hueso originado por una menor producción ovárica de estrógenos y progesterona, hormonas que asumen un importante rol en el metabolismo óseo⁸. En general, se considera que durante el curso de la OP los huesos se hacen cada vez más frágiles y susceptibles de fracturarse, siendo muy difícil poder recuperar el material perdido. Es importante destacar que el hueso no es una masa mineralizada adinámica, muy por el contrario, hay un constante desarrollo y mantenimiento del tejido óseo donde están involucrados varios procesos complejos que incluyen crecimiento endocondral, modelación y remodelación^{5, 7, 9, 11, 12}.

Epidemiológicamente, la OP del ser humano es la enfermedad metabólica del hueso más frecuente en los países desarrollados y su incidencia aumenta exponencialmente después de los 50 años de edad¹. Considerando la fisiopatología de la OP, en especial la posmenopáusica, se observa que los efectos de la deficiencia hormonal son de alta complejidad, destacándose los relacionados con un aumento en la frecuencia de activación de nuevos sitios de remodelado en el tejido esponjoso y cortical^{6, 26}.

La OMS ha categorizado el diagnóstico de OP en base a la cuantificación de la densidad mineral ósea y del contenido mineral óseo, realizada mediante densitometría dual de rayos X (DXA)³¹. Sin embargo, algunos autores cuestionan la técnica DXA imputándole falta de sensibilidad, a pesar de su amplia difusión en el diagnóstico humano de OP, sosteniendo que esta técnica solo tiene un valor indicativo osteológico que no va más allá de la confirmación de una osteopenia, ya que realiza una absorciometría de proyección de estructuras volumétricas óseas en solo dos dimensiones, sin valorar su verdadera resistencia^{9, 10}. En el terreno de la investigación, se considera que la rata ovariectomizada, sometida o no a dietas deficientes en calcio, sería el mejor modelo experimental de OP humana posmenopáusica¹⁵.

El objetivo del presente ensayo fue determinar los efectos de la terapia de reemplazo hormonal sobre el te-

jido trabecular óseo en este modelo de OP experimental, así como observar el comportamiento hemático y óseo de analitos directamente relacionados al metabolismo del hueso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron ratas hembras de la cepa Wistar de 4 meses de edad, agrupadas aleatorizadamente en lotes castrado ($n = 24$) y control ($n = 21$). El ensayo duró 19 meses. Seis meses antes de su finalización, la mitad de los animales castrados recibió cinco dosis SC mensuales de 250 μg de benzoato de estradiol y 6,25 mg de caproato de hidroxiprogesterona. A los 30 días del último tratamiento las ratas fueron sacrificadas por “sangría a blanco” vía intracardiaca, previa anestesia con hidrato de cloral (300 mg/kg vía IP). Las muestras de sangre se extrajeron mediante jeringas con y sin heparina; también fueron separados los miembros posteriores para realizar las determinaciones químicas y los estudios histopatológicos.

Las concentraciones séricas de calcio, magnesio y cobre se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica en equipo GBC 932–AB. Por espectrofotometría de absorción molecular realizada en aparato Perkin Elmer modelo Lambda 25 con módulo digital computarizado, se determinaron las concentraciones séricas de fósforo inorgánico (molibdato de amonio en medio ácido, con lectura a 340 nm) y fosfatasa alcalina (método optimizado de punto final con sustrato de fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado, lectura a 520 nm).

Las mismas determinaciones se realizaron sobre muestras de huesos desecadas a 100°C durante 48 horas, pesadas y luego disgregadas por digestión húmeda caliente nitro–perclórica. El hueso utilizado fue la tibia izquierda de cada animal, expresándose los resultados sobre base de materia seca. Los valores de referencia considerados para la química sanguínea y del tejido óseo fueron los publicados por algunos autores^{22, 24}.

Los estudios histopatológicos fueron realizados con las tibias derechas fijadas en formol neutro al 10% y descalcificadas con una solución de citrato de sodio–ácido fórmico; se realizaron cortes de 5 a 7 μm de espesor, que fueron coloreados con hematoxilina–eosina. En el análisis digital de las imágenes se utilizó el sistema Image Pro–Plus 4.1.0.1® (Media Cybernetics,

Tabla 1. Valores de magnificación de áreas según el aumento del objetivo utilizado.

objetivo	cada pixel de la imagen corresponde a:	cada imagen representa un área de:
X 4	2,68 μm	22 mm^2
X 10	1,04 μm	0,33 mm^2
X 40	0,26 μm	0,02 mm^2

Tabla 2. Valores obtenidos para el espesor trabecular (μm) en cada lote.

lote	control	castrado + hormonas	castrado sin tratamiento
n	10	7	7
media	43,087 ^a	43,472 ^a	30,929 ^b
límite inferior	37,725	40,819	26,072
límite superior	48,449	46,125	35,785
desvío estándar	7,4956	2,8683	5,2514

^{a,b} Letras distintas indican valores de medias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Silver Spring, MA, USA), conectado a una PC Pentium III Intel. Las imágenes fueron generadas por una video cámara Sony Exwavel HAD, conectada a un microscopio Olympus Ch2 con fuente de energía estabilizada. Se utilizaron lentes objetivas planocromáticas de 4, 10 y 40 X que en función del valor de los pixeles utilizados, proporcionó la superficie del área considerada (Tabla 1). El microscopio fue calibrado para lograr una iluminación tipo Koehler, utilizándose una imagen de campo vacío para calibrar la iluminación. Las imágenes fueron almacenadas en formato JPG, con una resolución de 640 x 480 pixeles de tamaño y 32 bits de color.

Las variables cuantitativas continuas en sangre y hueso (calcio, fósforo, magnesio, cobre y fosfatasa alca-

lina) fueron sometidas al análisis de la varianza (ANOVA), con el auxilio de un *software* bioestadístico (Statix 3.5, 1991), para un diseño completamente aleatorio a una sola vía (efecto tratamiento), utilizándose como criterio para descartar la hipótesis nula un límite de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2 indica que el espesor de las laminillas óseas en el lote castrado sin tratamiento fue significativamente menor a las del resto de los animales. No se registraron diferencias entre el lote castrado con tratamiento hormonal y el lote control. En el análisis estadístico se comprobaron los supuestos de normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia de los datos. El valor de la media del lote no tratado indica una pérdida del 28,2% en el espesor de las laminillas. Esto es coincidente con estudios histológicos realizados con ratas ovariectomizadas, donde se observaron disminuciones marcadas del volumen óseo^{16, 27, 29}, que no pudieron ser puestas en evidencia por el examen densitométrico^{3, 4}.

En las Figuras 1 y 2 se pueden observar algunos detalles de la forma en que se realizó el análisis sobre las imágenes de los cortes histológicos digitalizados. En dichas figuras, los números ubican las zonas donde fue determinado el espesor de las laminillas óseas.

La Tabla 3 muestra los valores de los analitos determinados en suero sanguíneo. El ANOVA indicó significación estadística solamente para las disminuciones de magnesio en ambos lotes castrados y de fosfatasa alcalina en el lote castrado que recibió tratamiento hormonal. Resultados diferentes se reportaron en ratas ovariectomizadas, en las cuales fue registrada una mayor actividad de fosfatasa alcalina respecto a los controles

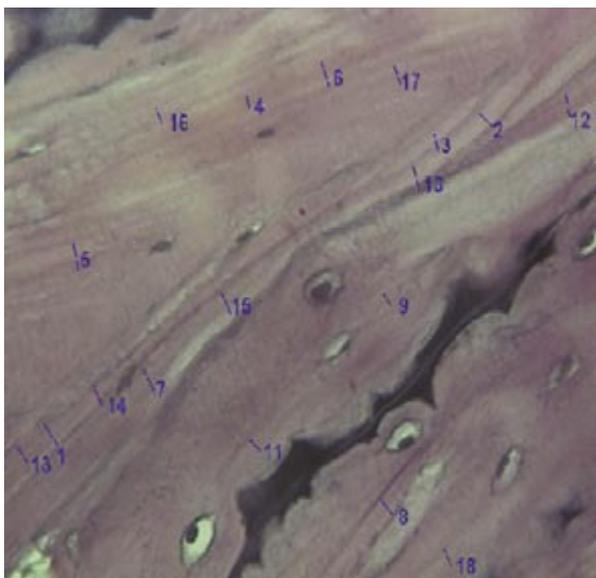


Figura 1. Corte longitudinal del extremo proximal de la tibia de una rata del lote castrado y tratado hormonalmente. Los números indican los sitios donde se determinó el espesor trabecular.

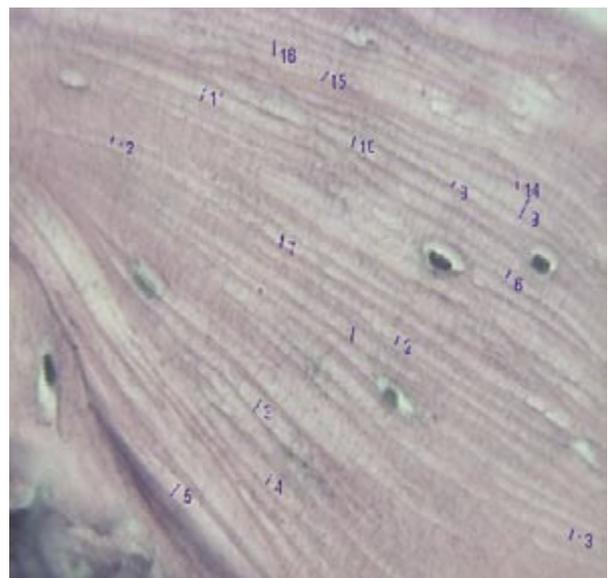


Figura 2. Corte longitudinal del extremo proximal de la tibia de una rata del lote castrado que no recibió tratamiento hormonal. Los números indican los sitios donde se determinó el espesor trabecular.

Tabla 3. Valores séricos obtenidos para los diferentes analitos ($\bar{x} \pm DE$), por lote.

parámetro	control (n = 11)	castrado (n = 6)	castrado + hormonas (n = 8)
calcio (mg/dl)	8,32 ± 1,12	9,48 ± 1,25	9,53 ± 1,74
fósforo inorgánico (mg/dl)	4,48 ± 0,14	3,12 ± 0,14	4,92 ± 0,126
magnesio (mg/dl)	2,40 ± 0,32	1,76 ± 0,86	1,82 ± 0,22
fosfatasa alcalina (UI/l)	82,29 ± 50,93	86,28 ± 41,342	63,16 ± 24,30
cobre (ug/dl)	132,18 ± 15,20	127,50 ± 22,21	122,75 ± 16,64

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar.

Tabla 4. Valores minerales obtenidos en el hueso tibial ($\bar{x} \pm DE$), por lote.

parámetro	control (n = 12)	castrado (n = 6)	castrado + hormonas (n = 8)
calcio (mg/g)	334,14 ± 25,89	338,82 ± 28,08	322,06 ± 82,99
fósforo (mg/g)	174,58 ± 58,15	173,92 ± 65,36	171,95 ± 63,47
magnesio (mg/g)	6,09 ± 0,22	6,07 ± 0,29	6,13 ± 0,13
cobre (ug/g)	11,72 ± 3,30	11,49 ± 4,34	13,54 ± 1,60

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar.

¹³, aunque los datos del presente estudio son similares a comunicados para ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos a los 3 y 6 meses de ensayo ¹⁴. Ello indicaría que el estrógeno contrarresta el efecto negativo de la extirpación ovárica sobre el hueso, normalizando su remodelación, ya que el proceso de resorción se incrementa ante el déficit de esta hormona ³⁰. El comportamiento de calcio y fósforo en suero resultó concordante al observado en algunas investigaciones ^{2, 18}, aunque distinto al registrado en otras, donde no se constataron diferencias entre ratas ovariectomizadas y ratas sometidas a simulacros de cirugía, pese a que en las últimas la eliminación de calcio por orina fue mayor ¹⁹.

En otros ensayos efectuados sobre ratas ovariectomizadas, el tratamiento con estrógenos incrementó la calciuria, en contraposición a lo observado frecuentemente en mujeres menopáusicas ^{6, 20}. Algunos investigadores hallaron incrementos de calcio y disminuciones de fósforo inorgánico y fosfatasa alcalina en suero de ratas sometidas a simulacros de cirugía, respecto a ovariectomizadas a los 6 y 9 meses del acto quirúrgico ²⁵. Asimismo, existen trabajos donde no se encontraron diferencias de los niveles séricos de calcio, fósforo inorgánico y actividad de fosfatasa alcalina entre ratas controles y ovariectomizadas, a pesar de que en las últimas se verificaron incrementos en la reabsorción del hueso ³². Por otro lado, la deficiencia de estrógenos también provoca disminución de la absorción intestinal de calcio ².

En la Tabla 4 se expone las concentraciones de minerales obtenidas en huesos. El ANOVA no reveló diferencias significativas entre lotes, para ninguno de los minerales estudiados. Estos resultados son diferentes a los encontrados en trabajos anteriores realizados con ratas castradas utilizando las mismas técnicas analíticas ³, en tanto que son coincidentes con los valores de la concentración mineral ósea obtenidos por densitometría ^{3, 4}. En cambio, en otras investigaciones se ha reportado que el contenido mineral óseo y la densidad mineral ósea disminuyen en ratas hembras con retroversión uterina ²¹,

así como en ratas ovariectomizadas y ratas machos tratadas con parathormona ²³.

Otros autores encontraron que en ratas el grado de osteopenia ocasionado por la ovariectomía no tiene relación con el nivel de calcio de la dieta ni con la eficacia en la absorción intestinal de calcio ¹⁷. Los resultados aquí obtenidos también son diferentes a los registrados en estudios donde se evaluó el contenido mineral óseo en ratas de edad avanzada sometidas a restricción alimentaria y suplementación de calorías con distintos porcentajes de grasa ²⁸.

Se concluye que la terapia con estrógeno–progesterona, aún a pesar de ser instaurada tardíamente, logra mantener el espesor trabecular

del tejido óseo esponjoso tibial en ratas ovariectomizadas, en contraposición a la disminución significativa de dicho espesor (28,2%) registrada en hembras castradas que no recibieron dicho tratamiento. La magnesemia fue significativamente menor en ambos lotes castrados y la fosfatasa alcalina solo disminuyó en el suero de los animales castrados que recibieron tratamiento hormonal. La concentración ósea de minerales no registró diferencias significativas entre lotes.

Agradecimiento: A la Lic. María Emilia García Denecri por la valiosa colaboración prestada.

REFERENCIAS

1. **Barret–Connor E.** 1995. The economics and human cost of osteoporotic fracture. *Am J Med* 98: 3–8.
2. **Blanusa M, Matkovic V, Kostial K.** 1978. Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. *Pflugers Arch* 375: 239–244.
3. **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.
4. **Brem JJ, Trulls HE, Lanari–Zubiaur AE, Picot JA, Pochón DO, Brem JC.** 2005. Concentración mineral ósea (CMO) por densitometría ósea dual de rayos X en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno–progesterona. *Anales XXVI Sesiones de Comunicaciones Científicas*, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Corrientes, Argentina, comunicación N° 5.
5. **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.
6. **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.
7. **Cointry GR, Cazzoza RF, Ferretti JL, Frost HM.** 2003. Hacia un diagnóstico antropométrico de las osteopenias y un diagnóstico biomecánico de las osteoporosis. *Medicina* 63: 737–747.
 8. **Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF, Eriksen EF, Mann KG, Riggs BL.** 1988. Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics and biochemical markers. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 741–748.
 9. **Ferretti JL.** 1997. Biomechanical properties of bone. In: *Osteoporosis and Bone Densitometry* (Genant HK, Giuglielmi G, Jergas M Ed), Springer Verlag, Berlin.
 10. **Ferretti JL, Cazzoza RF, Zanchetta JR.** 1996. Mechanical validation of a tomographic (pQTC) index for the noninvasive measurement of rat femur bending strength. *Bone* 18: 97–102.
 11. **Frost HM.** 1973. *Bone Modeling and Bone Modeling Errors*, Thomas, Springfield.
 12. **Frost HM.** 1993. Suggest fundamental concepts in skeletal physiology. *Calcif Tissue Int* 52: 1–4.
 13. **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. Heterogenic decrease of bone mineral density in the vertebral column of ovariectomized rats. *Bone*. 16: 2955–3005.
 14. **Garner-Sanford C, Anderson JB, Mar MH, Parikh I.** 1991. Estrogen reduce bone loss in the ovariectomized lactating rat model. *Bone Min* 15: 19–31.
 15. **Han SM, Szarzanowicz TE, Ziv I.** 1998. Effect of ovariectomy and calcium deficiency on the ultrasound velocity, mineral density and strength in the rat femur. *Clin Biochem* 13: 480–484.
 16. **Higdon K, Scott A, Tucci M, Benghuzzi H, Tsao A, Puckett A, Cason Z, Hughes J.** 2001. The use of estrogen, DHEA and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. *Biomed Sci Instrum* 37: 281–286.
 17. **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.
 18. **Kalu DN, Liu CC, Salerno E, Hollis B, Echon R, Ray M.** 1991. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 β -estradiol. *Bone Miner* 14: 175–187.
 19. **Koppo K, Hannuniemi R, Virtamo T, Lauren L, Ika-Vallo 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.
 20. **Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, McDonald EB, Anderson JB, Clarke AC.** 1976. Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. Evidence for an increased bone mass after delayed onset of oestrogen treatment. *Lancet* 1 (7968): 1038–1041.
 21. **López-Castejon A, Revilla M, Hernández ER, Villa IF, Rico H, Cortes J.** 1999. Effect of induced uterine retroversion on bone mass in rats. *Eur J Obstet Gynec Reprod Biol* 83: 101–104.
 22. **McDowell LR, Conrad JH, Ellis GL, Loosli JK.** 1984. *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales*, Ed. Cooperative Extension Service, University of Florida, 92 p.
 23. **Mitlak BH, Schoenfeld D, Neer RM.** 1994. Accuracy, precision and utility of spine and whole-skeleton mineral measurement by DXA in rats. *J Bone Miner Res* 9: 119–126.
 24. **Mitruka BM, Rawnsley HM.** 1984. Guide to the care and use of experimental animals. *Can Council Anim Care* 1: 83–91.
 25. **Ohnishi H, Nakamura IT, Narusawa IK, Murakami IH, Abe M, Barbier A, Susuki K.** 1997. Bisphosphonate tiludronate increases bone strength by improving mass and structure in established osteopenia after ovariectomy in rats. *Bone* 21: 335–343.
 26. **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.
 27. **Rico H, Roca-Botran C, Hernández ER, Seco C, Páez E, Valencia MJ, Villa LF.** 2000. The effect of supplemental copper on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Menopause* 7: 413–416.
 28. **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.
 29. **Sasaki T, Ohyori N, Debari K, Ramamurthy NS, Golub LM.** 1999. Effects of chemically modified tetracycline, CMT-8 on bone loss and osteoclast structure and function in osteoporotic states. *Ann N Y Acad Sci* 878: 347–360.
 30. **Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH.** 1987. The effects of ovariectomy and 17 β -estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Min Res* 2: 115–122.
 31. **World Health Organization.** 1994. Assessment of fracture risk and its applications to screening for postmenopausal osteoporosis. *WHO Tech Rep Ser* 843: 1–129.
 32. **Zeni S, Gomez-Acotro C, Mautalen C.** 1997. Effect of olpadronate in ovariectomized thyroxine treated rats. *Bone* 21: 329–333.