

Osteoporosis experimental en ratas ovariectomizadas: densitometría ósea y concentración de minerales en sangre y cenizas de hueso *

Brem, J.J.¹; Trulls, H.E.¹; Lanari Zubiaur, A.E.³;
Ortíz de Rus, L.M.²; Pochón, D.O.¹; Picot, J.A.¹; Brem, J.C.¹

Cátedra de Biofísica ⁽¹⁾ y Laboratorio de Análisis Físicoquímicos ⁽²⁾, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Tel/Fax 03783–430101, E–mail: fisbiol@vet.unne.edu.ar.

⁽³⁾ Diagnóstico por Imágenes TC–2000, Catamarca 744, Corrientes (3400), Argentina.

Resumen

Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Lanari Zubiaur, A.E.; Ortíz de Rus, L.M.; Pochón, D.O.; Picot, J.A.; Brem, J.C.: Osteoporosis experimental en ratas ovariectomizadas: densitometría ósea y concentración de minerales en sangre y cenizas de hueso. *Rev. vet. 15: 2, 56–61, 2004.* La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica, caracterizada por una disminución de la masa ósea y deterioro de su microarquitectura, con pérdida de tenacidad y alto riesgo de fracturas frente a fuerzas deformantes de escasa intensidad. La densitometría dual por rayos X (DXA) es una herramienta muy utilizada para evaluar la integridad ósea en pacientes humanos con antecedentes de osteopatías. En medicina veterinaria se la utiliza con el auxilio de un software especial para pequeñas especies. Estudios experimentales demostraron correlaciones muy significativas respecto al contenido mineral de las cenizas óseas con lesiones histológicas e histomorfométricas encontradas en el hueso. El objetivo fue determinar las variaciones de algunos minerales en sangre y tejido óseo, así como cambios densitométricos en huesos, en un modelo de osteoporosis experimental (ratas ovariectomizadas). Se utilizaron 40 ratas hembras de la cepa Wistar, de 60 a 70 días de edad, conformándose un lote testigo (sin cirugía) y otro ovariectomizado, con 20 animales cada uno. Durante los 270 días de ensayo se realizaron tres mediciones densitométricas en 5 animales por lote. Las variables de referencia fueron: contenido mineral óseo (BMC) y densidad mineral ósea (BMD), realizadas sobre cuerpo entero y en 3 regiones predeterminadas. Asimismo se realizaron determinaciones de calcio, fósforo inorgánico, magnesio, manganeso, cobre y fosfatasa alcalina. Las ratas ovariectomizadas desarrollaron osteoporosis y acusaron modificaciones significativas ($p < 0,05$) de peso corporal, calcio y magnesio séricos y calcio, fósforo inorgánico y manganeso del tejido óseo, con relación a los controles. No se registraron diferencias en BMC, en tanto que BMD disminuyó significativamente hacia los 6 meses de castración en las regiones lumbar y femoral. A los 9 meses la osteoporosis afectó la BMD de todos los huesos del cuerpo.

Palabras clave: rata, osteoporosis por ovariectomía, minerales, densidad mineral ósea, concentración mineral ósea.

Abstract

Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Lanari Zubiaur, A.E.; Ortíz de Rus, L.M.; Pochón, D.O.; Picot, J.A.; Brem, J.C.: Experimental osteoporosis in ovariectomized rats: densitometry and mineral behaviors in blood and bone tissue. *Rev. vet. 15: 2, 56–61, 2004.* Osteoporosis is a systemic bone disease, characterized by a bone mass depletion and deterioration of its microstructure, together with loss of tenacity and high risk of fractures due to deforming forces of slight intensity. Dual energy X–ray absorptiometry (DXA) is a useful tool to evaluate bone integrity in human patients with osteopathies. This technique is used in veterinary medicine, with special equipments and software adapted to small animals. Previous studies in animals reported significant correlations regarding mineral content of ashes and histological and histomorphometric alterations found in the bone. The purpose of this study was to determine the behavior of some minerals in blood and bone tissue in an experimental

osteoporosis model, using ovariectomized rats, and to confirm densitometric changes in the bone. Female Wistar rats, 60 to 70 day-olds, were grouped in two lots: Controls (non ovariectomized) and ovariectomized, 20 animals each. Duration of the assay was 270 days, and 3 densitometric determinations were performed in 5 randomly chosen animals. Reference variables for bone density were the determination of bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD), studied in total carcass and 3 predetermined regions (lumbar and sacra column and proximal third of the humerus). Biochemistry determinations of calcium, inorganic phosphorus, magnesium, manganese, copper and alkaline phosphatase were performed as well. Significant differences were found concerning body weigh, seric calcium and magnesium, and calcium, phosphorus and manganese in bone tissue. No differences were observed in BMC in both lots, whereas BMD significantly decreased from the 6th month after castration, in lumbar and femoral regions. After the 9th month, the absence of ovaries affected bone density in all the concerned regions, as well as the values obtained for total carcass.

Key words: rat, osteoporosis by ovariectomy, minerals, bone mineral density, bone mineral content.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis (OP) es una enfermedad sistémica en la que los huesos se vuelven frágiles. Las mujeres desarrollan la enfermedad con una frecuencia cuatro veces mayor respecto a los hombres. La OP Tipo I (postmenopáusica) está asociada a compresiones vertebrales y fracturas de cadera, que ocurren en mujeres entre 15 y 20 años después de la menopausia⁵. La masa ósea también disminuye con la edad (OP Tipo II) y se produce en seres humanos de ambos sexos y mayores de 70 años. Es decir, la OP Tipo I resulta de factores relacionados a efectos hormonales, en tanto que la OP Tipo II se vincula con el proceso de la senescencia.

Ratas ovariectomizadas sometidas a dietas deficientes en calcio constituirían un buen modelo experimental de la OP humana postmenopáusica¹⁰. Estudios histológicos en ratas ovariectomizadas mostraron disminuciones marcadas del volumen óseo^{11, 30, 33}. Con relación a otros roedores como conejos y cobayos, la rata revela poseer un más elevado metabolismo óseo²⁵.

La densitometría dual por rayos X (DXA) es muy utilizada para evaluar la integridad ósea en pacientes humanos con antecedentes de osteopatías, especialmente OP. Asimismo, en estudios experimentales con animales, se han encontrado correlaciones muy significativas de este método con lesiones histológicas e histomorfométricas^{3, 9, 17} y con los análisis químicos del contenido mineral del hueso o cenizas^{6, 13, 18, 23, 28, 31, 35}. La DXA realizada mediante un software especial para pequeños animales es una excelente técnica para medir la densidad mineral ósea en ratas^{1, 12, 16, 21, 26}, aunque se recomiendan distintas condiciones de trabajo del equipo para cada zona del cuerpo en particular, a diferencia de la utilizada para cuerpo entero.

El presente ensayo es parte de un proyecto que pretende lograr un modelo experimental adecuado de OP Tipo I en ratas ovariectomizadas, y sobre ellas evaluar distintas alternativas terapéuticas. En este caso, los objetivos fueron constatar el comportamiento de la den-

sitometría ósea y de la concentración de minerales a nivel de huesos y sangre relacionados a la actividad del tejido óseo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, de 60 a 70 días de edad, que fueron agrupadas en forma aleatoria (5 animales por jaula). Se conformaron dos lotes de 20 animales cada uno: testigos (sin cirugía) y ovariectomizados (extirpación de ambos ovarios bajo anestesia general con hidrato de cloral: 300 mg/kg IP). El control de peso corporal se efectuó mensualmente mediante balanza adecuada.

El ensayo duró 270 días y se realizaron mediciones densitométricas cada 3 meses sobre 5 animales por lote elegidos por sorteo. Las variables de referencia para evaluar los efectos sobre la densidad del tejido óseo en el modelo experimental fueron las determinaciones del contenido mineral óseo (BMC, expresado en gramos) y densidad mineral ósea (BMD, en g/cm²). Los estudios se hicieron sobre cuerpo entero y sobre 3 regiones predeterminadas (columna lumbar, sacra y tercio proximal del fémur de ambos lados). Fueron efectuadas 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. El equipo cuenta con el auxilio de un software especial para pequeños animales, con un calibrado previo mediante una escalera de acrílico *ad hoc* para realizar una curva estándar de densidad.

A los 9 meses de ensayo todas las ratas fueron sacrificadas por "sangría a blanco", extrayéndose vía intracardiaca muestras de sangre con fines analíticos; simultáneamente también fueron separados los miembros anteriores y posteriores. Las determinaciones séricas de calcio, magnesio, manganese y cobre se efectuaron por espectrofotometría de absorción atómica en equipo GBC 932-AB. Asimismo, se realizaron determinaciones colorimétricas de fósforo inorgánico (P) con mo-

libdato de amonio en medio ácido, lectura a 340 nm, y de fosfatasa alcalina (ALP) según método optimizado de punto final con sustrato de fenil-fosfato de sodio en medio alcalino tamponado, lectura a 520 nm. Ambas determinaciones se efectuaron por espectrofotometría de absorción molecular en aparato Perkin Elmer modelo Lambda 25 con módulo digital computarizado.

Las mismas determinaciones minerales fueron efectuadas sobre muestras de huesos desecadas a 100°C durante 48 horas, pesadas y luego disgregadas por digestión húmeda caliente nitro-perclórica. Se utilizó el fémur derecho de cada animal y los resultados fueron expresados sobre materia seca. Como valores de referencia para la química sanguínea y el tejido óseo se utilizaron los publicados para ratas por otros autores^{22,24}.

Las variables cuantitativas continuas en sangre y hueso (Ca, P, Mg, Mn, ALP) y densitométricas (BMC, BMD), así como el peso corporal, fueron procesadas para obtener estadísticas descriptivas y luego sometidas a análisis de la varianza (Statistix), a partir de 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

El peso corporal aumentó progresivamente en las hembras castradas, llegando a ser altamente significativo ($p < 0,001$) hacia el final del ensayo (Tabla 1).

Tabla 1. Peso corporal inicial y final (g) registrado en cada lote.

	castradas (n = 15)		testigos (n = 15)	
	día 0	día 270	día 0	día 270
\bar{x}	201,5	389,5	198,0	354,6
DE	8,54	18,43	11,10	9,30
IC < 95%	187,9	215,1	140,3	331,6
IC > 95%	360,2	418,8	195,7	377,8

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar, IC: intervalo de confianza.

Las determinaciones químicas realizadas en el suero de ambos lotes arrojaron los resultados que figuran en las Tablas 2 y 3. El ANOVA declaró diferencias significativas para calcio ($p < 0,0001$) y magnesio séricos ($p < 0,004$), pero no se registraron diferencias para fósforo inorgánico ni fosfatasa alcalina entre ambos lotes. Este hallazgo concuerda con resultados obtenidos tanto en ratas ovariectomizadas como en ratas machos tratadas con parathormona²³. 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 calcio¹⁵. En cambio no es coincidente con las observaciones de incrementos séricos de calcio y disminuciones de fósforo inorgánico y ALP en ratas con simulacro de cirugía respecto a las ovariectomizadas, a los 6 y 9 meses después de la operación quirúrgica.

Por otro lado, en ratas que recibieron dosis bajas y medias de *tiludronato*, no se registraron diferencias de calcio y ALP en suero, aunque el fósforo inorgánico se incrementó respecto a los controles ovariectomizados²⁷. Contrariamente, no hubo diferencias en los niveles séricos de calcio, fósforo inorgánico y actividad ALP entre ratas controles y ovariectomizadas, a pesar de que en estas últimas hubo incremento en la reabsorción de hueso³⁶; tampoco se observaron diferencias de calcio y fósforo séricos entre ratas sometidas a simulacro y ratas ovariectomizadas¹⁶, aunque la eliminación de calcio por orina fue mayor en estas últimas, en concordancia con lo reportado por otros^{2,14}.

Tabla 2. Valores de minerales séricos obtenidos en animales testigos.

	Ca (mg/dl)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	ALP(U/l)
n	16	16	8	10
\bar{x}	7,65	1,63	5,43	253
DE	1,11	0,19	1,35	64
IC < 95%	7,06	1,53	4,30	207
IC > 95%	8,24	1,73	6,56	299
CV %	15	12	25	25

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar, IC: intervalo de confianza, CV: coeficiente de variación.

Tabla 3. Valores de minerales séricos obtenidos en animales ovariectomizados.

	Ca (mg/dl)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	ALP (U/l)
n	15	15	12	10
\bar{x}	9,47	1,89	5,04	254
DE	1,11	0,27	1,21	9
IC < 95%	8,86	1,74	4,26	188
IC > 95%	10,08	2,04	5,80	322
CV %	12	14	24	36

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar, IC: intervalo de confianza, CV: coeficiente de variación.

En otros ensayos, el tratamiento con estrógenos en ratas ovariectomizadas incrementó la eliminación de calcio por la orina, en contraposición a lo encontrado en mujeres menopáusicas^{4,19}. La deficiencia de estrógenos a su vez provoca una disminución en la tasa de absorción intestinal de calcio². También pudo observarse que ratas ovariectomizadas tuvieron mayor actividad ALP respecto a controles y ovariectomizadas 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 esta hormona^{7,8,34}.

Las determinaciones químicas realizadas sobre el fémur de ambos lotes arrojaron los resultados que se exponen en las Tablas 4 y 5. Para las concentraciones de minerales en tejido óseo, el ANOVA indicó que en el lote ovariectomizado ocurrieron descensos significativos de calcio ($p < 0,0001$), fósforo inorgánico (p

< 0,003) y manganeso ($p < 0.0003$). No se registraron diferencias entre ambos lotes para las concentraciones óseas de cobre y magnesio.

Tabla 4. Concentración ósea de minerales en animales testigos ($n = 16$).

	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Mg (mg/g)	Mn (ug/g)	Cu (ug/g)
\bar{x}	319,06	171,84	6,13	9,46	4,45
DE	32,21	9,64	1,06	2,69	3,44
IC < 95%	301,89	166,69	5,56	8,03	2,61
IC > 95%	336,23	176,98	6,69	10,90	6,28
CV %	10	6	17	28	77

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar, IC: intervalo de confianza, CV: coeficiente de variación.

Tabla 5. Concentración ósea de minerales en animales ovariectomizados ($n = 16$).

	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Mg (mg/g)	Mn (ug/g)	Cu (ug/g)
\bar{x}	257,01	161,28	5,32	6,60	4,46
DE	36,26	9,06	0,60	0,82	2,86
IC < 95%	237,68	156,45	4,99	6,16	2,93
IC > 95%	276,33	166,11	5,64	7,04	5,99
CV %	14	6	11	13	64

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar, IC: intervalo de confianza, CV: coeficiente de variación.

Los resultados de los estudios densitométricos se muestran en las Tablas 6 y 7. Para BMC, el ANOVA no halló diferencias significativas con relación al tratamiento ni al tiempo, pero en BMD surgieron diferencias significativas para el lote castrado, tanto a los 6 meses para las regiones 1 ($p < 0,05$) y 3 ($p < 0,0121$), como a los 9 meses en cuerpo total ($p < 0,002$), regiones 1 ($p < 0,0239$) y 2 ($p < 0,0015$).

Estos valores son similares a los obtenidos por autores que realizaron estudios comparativos entre densitometría ósea y análisis químicos directos¹³, aunque ellos encontraron que las diferencias significativas del contenido mineral del hueso obtenido con la técnica densitométrica sobrevalora a los animales con bajos contenidos y subestima a los más altos. En nuestro caso se observa que las diferencias de concentración en algunos minerales en huesos de animales ovariectomizados no se reflejan en los valores dados para BMC por densitometría. En otros trabajos se pudo demostrar que el contenido mineral óseo y la densidad mineral ósea disminuyen en ratas hembras con retroversión uterina²⁰. Asimismo, los resultados son similares a los de investigaciones que evaluaron los efectos sobre el contenido mineral óseo en ratas de edad avanzada sometidas a restricción alimentaria y suplementación de calorías con distintos porcentajes de grasa³².

Considerando la fisiopatología de la OP, y en especial la postmenopáusica, el hecho más relevante es el déficit estrogénico que lleva al incremento de la pérdi-

Tabla 6. Valores de BMC ($\bar{x} \pm DE$) en animales ovariectomizados (T) y controles (C), en gramos.

mes	cuerpo total		región 1		región 2		región 3	
	T	C	T	C	T	C	T	C
3	5,04 $\pm 0,34$	4,85 $\pm 0,28$	0,48 $\pm 0,03$	0,48 $\pm 0,07$	0,16 $\pm 0,02$	0,14 $\pm 0,02$	0,15 $\pm 0,01$	0,13 $\pm 0,02$
6	5,51 $\pm 0,34$	5,02 $\pm 0,56$	0,51 $\pm 0,06$	0,42 $\pm 0,08$	0,15 $\pm 0,02$	0,15 $\pm 0,03$	0,15 $\pm 0,02$	0,14 $\pm 0,02$
9	5,49 $\pm 0,38$	5,73 $\pm 0,25$	0,50 $\pm 0,06$	0,46 $\pm 0,04$	0,15 $\pm 0,02$	0,15 $\pm 0,01$	0,14 $\pm 0,02$	0,16 $\pm 0,01$

Tabla 7. Valores de BMD ($\bar{x} \pm DE$) en animales ovariectomizados (T) y controles (C), en g/cm².

mes	cuerpo total		región 1		región 2		región 3	
	T	C	T	C	T	C	T	C
3	0,13 \pm 0,004	0,12 \pm 0,006	0,15 \pm 0,007	0,14 \pm 0,006	0,12 \pm 0,007	0,11 \pm 0,004	0,13 \pm 0,009	0,12 \pm 0,009
6	0,12 \pm 0,002	0,12 \pm 0,005	0,14 \pm 0,007	0,12 \pm 0,01	0,12 \pm 0,003	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,004	0,11 \pm 0,007
9	0,12 \pm 0,003	0,11 \pm 0,010	0,14 \pm 0,008	0,12 \pm 0,007	0,12 \pm 0,003	0,11 \pm 0,005	0,12 \pm 0,006	0,12 \pm 0,005

da de hueso. 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 remodelado en los huesos esponjoso y cortical²⁹. Esta hormona tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la densidad de los huesos y su déficit hace que la pérdida de hueso se vuelva excesiva, reflejándose en una disminución de su densidad, tal como fuera observado en este ensayo. Podemos decir que, 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.

Se concluye refirmando la idoneidad del modelo experimental de OP propuesto, en virtud de que en las ratas ovariectomizadas y bajo nuestras condiciones de trabajo, se hallaron diferencias significativas en el peso corporal, calcio y magnesio séricos y calcio, fósforo inorgánico y manganeso del tejido óseo. No se observaron cambios del contenido mineral óseo entre ambos lotes, pero la densidad mineral ósea disminuyó significativamente en la región lumbar y femoral hacia los 6 meses de castración, en tanto que a los 9 meses las diferencias densitométricas fueron muy significativas en todas las regiones consideradas, incluyendo las obtenidas sobre cuerpo entero.

Agradecimientos. Al Méd.Vet. Pedro A. Zeinsteger, por la valiosa colaboración prestada.

REFERENCIAS

1. Bertin E, Ruiz JC, Mourot J, Peiniau P, Portha B. 1998. Evaluation of dual-energy X-ray absorptiometry for composition assessment in rat. *J Nutr* 128: 1550-1554.

2. **Blanusa M, Matkovic V, Kostial K.** 1978. Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. *Pflugers Arch* 375: 239–244.
3. **Campodarve YO, Diez UN, Puig J, Serrano S, Marinoso 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.
4. **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.
5. **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.
6. **Gala Paniagua J, Díaz Curiel M, De La Piedra Gordo C, Castilla Reparáz C, Torralbo García M.** 1998. Bone mass assessment in rats by dual energy X–ray absorptiometry. *Br J Radiol* 71: 754–758.
7. **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: 295S–300S.
8. **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.
9. **Gyarmati JJ, Petko M, Jona I, Gyarmati J, Varga S.** 1984. Experimental calcipenic osteopathy. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 130: 583–592.
10. **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.
11. **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.
12. **Ito M, Hayashi K, Ito M.** 1990. Quantitative evaluation of bone mineral density of rat femur by using DEXA (dual energy x–ray absorptiometry). *Nipp Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 50: 1150–1152.
13. **Jebb SA, Garland SW, Jennings G, Elia M.** 1996. Dual energy X–ray absorptiometry for the measurement of gross body composition in rats. *Br J Nutr* 75: 803–809.
14. **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.
15. **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.
16. **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.
17. **Kunkel ME, Powers DL, Hord NG.** 1990. Comparison of chemical, histomorphometric, and absorptiometric analyses of bones of growing rats subjected to dietary calcium stress. *J Am Coll Nutr* 9: 633–640.
18. **Ladizesky MG, Zeni SN, Mautalen CA.** 1994. Precise measurement of bone mineral density in rats using dual–energy X–ray absorptiometry. *Acta Physiol Pharmacol* 44: 30–35.
19. **Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, Mac Donald 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.
20. **Lopez 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.
21. **Lu PW, Briody JN, Howman–Giles R, Trube A, Cowell CT.** 1994. DXA for bone density measurement in small rats weighing 150–250 grams. *Bone* 15: 199–202.
22. **McDowell LR, Conrad JH, Ellis GL, Loosli JK.** 1984. *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales*. Ed. Coop Ext Serv, Inst of Food and Agric Sci, Univ 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. *Canadian Council on Animal Care* 1: 83–91.
25. **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.
26. **Nakatsuka K, Nishizawa Y, Hagiwara S, Koyama H, Miki T, Ochi H, Morli H.** 1990. Effect of calcitonin on total body bone mineral content of experimental osteoporotic rats determined by dual photon absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 47: 378–382.
27. **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.
28. **Prakasam G, Yeh JK, Chen MM, Castro Magana M, Liang CT, Aloia JF.** 1999. Effects of growth hormone and testosterone on cortical bone formation and bone density in aged orchietomized rats. *Bone* 24: 491–497.
29. **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.
30. **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.
31. **Rose BS, Flatt WP, Martín 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.
32. 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 Geront Biol Sci Med* 52: B20–25.
 33. 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 NY Acad Sci* 878: 347–360.
 34. 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.
 35. Vanderschueren D, Van Herck E, Schot P, Rush E, Einhorn T, Geusens P, Bovillon R. 1993. The aged male rat as a model for human osteoporosis: evaluation by nondestructive measurements and biochemical testing. *Calcif Tissue Int* 53: 342–347.
 36. Zeni S, Gomez-Acoto C, Mautalen C. 1997. Effect of olpadronate in ovariectomized thyroxine treated rats. *Bone* 21: 329–333.