

Densidad ósea y concentración de minerales en sangre y huesos de ratas ovariectomizadas tratadas con alendronato*

Brem, J.J.¹; Trulls, H.E.¹; Ortiz de Rus, M.L.¹;
Lanari Zubiaur, A.E.²; Picot, J.A.¹; Benítez, W.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

²Diagnóstico por Imágenes TC-2000, Catamarca 744, Corrientes (3400), Argentina.

Resumen

Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Ortiz de Rus, M.L.; Lanari Zubiaur, A.E.; Picot, J.A.; Benítez, W.; Brem, J.C.: Densidad ósea y concentración de minerales en sangre y huesos de ratas ovariectomizadas tratadas con alendronato. *Rev. vet.* 17: 2, 88-93, 2006. La osteoporosis (OP) posmenopáusica provocada por bajos niveles de hormonas ováricas se manifiesta por pérdidas de masa ósea y resistencia biomecánica e incrementos de su fragilidad. Los bisfosfonatos, especialmente el alendronato, suprimen la resorción ósea por favorecer la apoptosis de osteoclastos y hasta podrían incrementar la masa ósea estimulando la maduración de precursores de osteoblastos. El objetivo del ensayo fue realizar la terapia con alendronato en este modelo experimental de OP y evaluar el comportamiento mineral en sangre y huesos, así como también valorar la densidad ósea obtenida por densitometría dual de rayos X. El ensayo duró 12 meses, utilizándose 33 ratas hembras de la cepa Wistar de 4 meses de edad, conformándose un lote castrado (C) con 22 animales y otro testigo (T) donde fue realizado un simulacro de castración (n=11). A los 3 meses la mitad de los animales ovariectomizados (Ct) fue dosificada semanalmente con alendronato vía oral (0,27 mg/animal) con el agua de bebida. Hacia el final del ensayo se realizaron densitometrías sobre cuerpo entero y ciertas regiones predeterminadas, utilizándose un equipo provisto de un software especial para pequeños animales. El análisis multivariado de las concentraciones de calcio, magnesio, cobre y fósforo inorgánico en sangre y tejido óseo, así como de fosfatasa alcalina sérica, no reveló diferencias significativas entre tratamientos, en coincidencia con los resultados del análisis univariado realizado para cada variable. Los datos de densidad mineral ósea (DMO) fueron similares entre lotes C y Ct, pero arrojaron diferencias significativas en región lumbar ($p < 0,008$) e isquiofemoral ($p < 0,001$) respecto a T. No hubo cambios de DMO en el resto de las regiones estudiadas así como tampoco en los valores de concentración mineral ósea. Se concluye que el alendronato, en la dosis y frecuencia utilizadas en el modelo experimental, no resultó eficiente para mantener una DMO normal.

Palabras clave: rata, castración, osteoporosis, alendronato, densitometría, minerales.

Abstract

Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Ortiz de Rus, M.L.; Lanari Zubiaur, A.E.; Picot, J.A.; Benítez, W.; Brem, J.C.: Densitometry and mineral content in blood and bone tissues in ovariectomized rats treated with alendronate. *Rev. vet.* 17: 2, 88-93, 2006. Postmenopausal osteoporosis (OP) caused by low levels of ovarian hormones is evidenced by loss of osseous tissue and bone biomechanical resistance decrease, as well as skeletal fragility increment. Bisphosphonates, especially alendronate, inhibit osseous resorption due to the induction of osteoclasts apoptosis; moreover, they may increase osseous mass, stimulating the differentiation and maturation of osteoblasts precursors. Purpose of this study was to perform an alendronate therapy in an experimental model of OP and evaluate mineral behaviour in blood and bones, as well as to measure bone density by means of dual energy X-ray absorptiometry (DXA). Thirty three female Wistar rats, four months-old were grouped in two lots: 22 castrated animals (C) and 11 control rats (T), subjected to a castration simulation; the test lasted 12 months. After three months, the half of ovariectomized rats (Ct) was orally treated every week with alendronate (0.27 mg/animal). By the end of the trial, densitometries over the whole body and some predetermined regions were performed. Studies were carried out

using an absorptometer, with a special software for small animals. No significant differences were found between treatments, concerning calcium, magnesium, copper, inorganic phosphorus and alkaline phosphatase concentrations using multivariate analyses. These results are coincident with univariate analyses used for each variable. Data from mineral osseous density (DMO) were similar between Ct and C lots, whether significant differences exist in lumbar ($p < 0.008$) and femoral–sciatic ($p < 0.001$) regions belonging to T lot. There were no statistically significant changes for DMO, neither in other studied regions nor at mineral osseous concentration values. It is concluded that alendronate, at the doses and frequency of administration used in this experimental model of OP, was unsuccessful to maintain a normal DMO.

Key words: rat, ovariectomy, osteoporosis, alendronate, densitometry, minerals.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis (OP) es un trastorno esquelético caracterizado por disminución de la resistencia ósea con un alto riesgo de fracturas frente a cargas de escasa intensidad^{15,37}. En las mujeres la OP es de Tipo I y está relacionada a factores hormonales, en tanto que el Tipo II se da más bien en el hombre y está más vinculada con la edad¹². Sin tratamiento y medidas preventivas adecuadas, la OP progresa de manera silenciosa e indolora hasta la ruptura de algún hueso². El hueso es una masa mineralizada que tiene un desarrollo y mantenimiento muy dinámico, donde están involucrados procesos muy complejos como ser crecimiento endocondral, modelación y remodelación^{9,10,16}.

Los bisfosfonatos son compuestos sintéticos análogos a pirofosfatos y tienen gran afinidad por los cristales de la matriz mineralizada, permaneciendo allí mucho tiempo ejerciendo una potente disminución de la resorción ósea. 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 en la enfermedad de Paget²⁴, hipercalcemia del cáncer^{3,38}, enfermedad metastásica ósea^{13,21} y osteoporosis^{4,8,29,43}. Se ha demostrado que los bisfosfonatos, especialmente el alendronato, suprimen la resorción ósea por favorecer la apoptosis de osteoclastos^{39,35} e inhibir su diferenciación durante su proceso de maduración³². 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 perros²⁷. Se desconoce la influencia de los bisfosfonatos sobre la formación ósea aunque se ha observado que inhiben la apoptosis osteoblástica y estimulan la diferenciación y maduración de estas células *in vitro*, lo que podría incrementar la formación de hueso^{1,18,34,39}.

Se trabajó con este modelo experimental pues algunos resultados confirman que ratas ovariectomizadas demostraron ser un modelo experimental adecuado de osteoporosis humana postmenopáusica^{5,17,19}. Estudios histológicos en ratas ovariectomizadas mostraron disminuciones marcadas del volumen óseo^{20,36,41} y del

espesor de las laminillas⁶. El objetivo del presente ensayo fue evaluar la respuesta terapéutica del alendronato dosificado semanalmente como tratamiento estratégico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo de 12 meses con 33 ratas hembras de la cepa Wistar de 4 meses de edad, conformándose un lote castrado (C) con 22 animales y otro testigo (T) donde fue realizado un simulacro de castración ($n = 11$); en ambos lotes algunos ejemplares murieron por complicaciones quirúrgicas. A los 3 meses de la cirugía, la mitad de los animales castrados fueron tratados semanalmente por vía oral con 0,27 mg/animal de alendronato vehiculizado en el agua de bebida, con ayuno previo de comida y agua por 12 horas, retornando a su dieta normal recién a las 8 horas de la medicación (lote Ct). Cabe destacar que este manejo del ayuno pre y postratamiento fue realizado para evitar disminuciones en la absorción de la droga a nivel digestivo, tal como esta recomendado²¹.

A los 30 días de la última dosis fueron sacrificadas por “sangría a blanco” vía intracardiaca. Las muestras de sangre con fines analíticos se extrajeron mediante jeringas con y sin heparina; así también fueron separados los miembros anteriores y posteriores para realizar los estudios químicos. Las determinaciones séricas de calcio, magnesio y cobre se efectuaron por espectrofotometría de absorción atómica en equipo GBC 932–AB. Para fósforo inorgánico (Pi) se utilizó la técnica del molibdato de amonio en medio ácido, lectura a 340 nm y para fosfatasa alcalina (FAL) el método optimizado de punto final con sustrato de fenil–fosfato de sodio en medio alcalino tamponado, lectura a 520 nm. Estas dos últimas determinaciones se realizaron por espectrofotometría de absorción molecular en espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25 con módulo digital computarizado.

Las mismas determinaciones minerales, a las que se les agregó la de manganeso, se realizaron sobre muestras de huesos desecadas a 100°C durante 48 horas, pesadas y luego disgregadas por digestión húmeda caliente nitro–perclórica. Se usó la tibia derecha de

cada animal y los resultados fueron expresados sobre materia seca. Los valores de referencia considerados para la química sanguínea y del tejido óseo son los publicados por algunos autores^{28,31}.

Hacia el final del ensayo, las densitometrías se realizaron sobre cuerpo entero y algunas regiones predeterminadas, utilizándose un equipo 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, dotado de un software especial para pequeños animales.

Las variables cuantitativas continuas en sangre y hueso fueron tratadas por comparación mediante análisis univariado de la varianza (ANOVA), y realizados mediante un software bioestadístico (Statistix 3.5, 1991) para un diseño completamente aleatorio (DCA) a una sola vía (efecto tratamiento), utilizándose como criterio para descartar la hipótesis nula un límite de confianza del 95%. También se realizó análisis multivariado de la variancia (MANOVA, Statistica 6.0, 2001), en función del número de variables químicas que se midieron tanto en plasma como en hueso. Por ser variables cuantitativas y a fines de observar en forma simplificada la dispersión de las observaciones y analizar las relaciones entre las variables, se efectuó análisis de componentes principales, método de ordenación de datos que permitió una representación geométrica de los individuos en una dimensión reducida de modo que se expresen sus diferencias y analogías.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Valores en suero sanguíneo: el ANOVA no reveló diferencias significativas de los parámetros Ca, Mg,

Cu, Pi ni FAL entre tratamientos. El análisis de componentes principales (MANOVA) refrendó que los lotes T, C y Ct fueron estadísticamente homogéneos (Figura 1). El componente principal 1 (CP1) es la combinación lineal establecida principalmente entre las variables Mg y Pi, en tanto que el componente principal 2 (CP2) lo es de Ca y FAL. La distribución de individuos en los tres tratamientos fue muy variada y aleatoria, pero la correlación cofenética resultó bastante alta, de 0,89, indicando que la reducción de la dimensionalidad prácticamente no produjo pérdida de información.

Estos resultados son coincidentes con los de trabajos donde no se encontraron diferencias en los niveles séricos de Ca, Pi y FAL entre ratas controles y ovariectomizadas⁴⁴. Otros autores registraron incrementos de Ca y disminuciones de Pi y FAL en suero de ratas con simulacro de cirugía respecto a ratas ovariectomizadas³³. En anteriores investigaciones no se observaron diferencias de Ca y Pi entre simulacros y ovariectomías verdaderas²⁵, aunque la calciuria fue mayor en estas últimas²³.

Valores en tejido óseo: tanto el ANOVA como el MANOVA (Figura 2) revelaron que las diferencias en las concentraciones de los analitos estudiados carecieron de significación estadística entre tratamientos. El componente principal 1 (CP1) es una combinación lineal principalmente de Mn, Cu, Pi y Ca con signo negativo, mientras que el componente principal 2 (CP2) lo es de Mg, P y Ca. La correlación cofenética también resultó elevada, de 0,946. Las ratas castradas con tratamiento se situaron más concentradas en el origen de los ejes, demostrando así menor variabilidad de los parámetros medidos respecto a las muestras testigos, que se hallaron más distribuidas en el plano de representa-

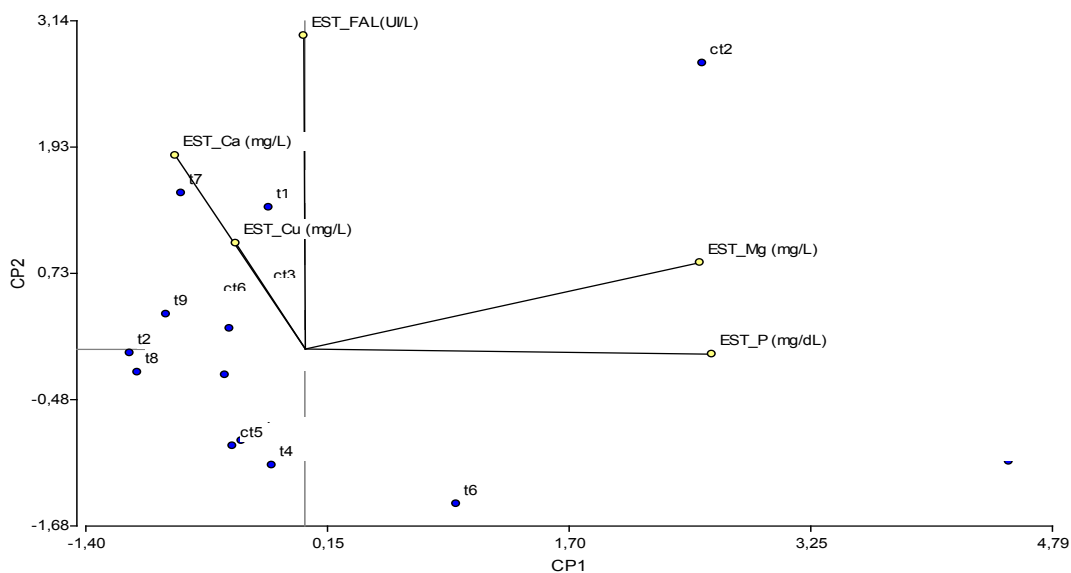


Figura 1. Análisis de componentes principales de las variables químicas determinadas en suero en los tres lotes bajo ensayo. CP1: componente principal 1, CP2: componente principal 2, EST: variables estandarizadas, t: ratas testigos, c: castradas, ct: castradas + alendronato. Cada cifra indica el número del animal.

Tabla 1. Valores de densidad mineral ósea (g/cm^2) obtenidos en las distintas regiones predeterminadas.

región analizada	testigos	castradas	castradas + alendronato
región lumbar	$0,1464 \pm 0,01$ (a)	$0,1243 \pm 0,01$ (b)	$0,1307 \pm 0,007$ (b)
isquiofemoral der.	$0,1326 \pm 0,009$ (a)	$0,1173 \pm 0,01$ (b)	$0,1187 \pm 0,006$ (b)
isquiofemoral izq.	$0,1274 \pm 0,006$ (a)	$0,1087 \pm 0,006$ (b)	$0,1183 \pm 0,008$ (b)
tibia + fémur der.	$0,0841 \pm 0,01$	$0,0767 \pm 0,002$	$0,0763 \pm 0,005$
tibia + fémur izq.	$0,0820 \pm 0,01$	$0,0733 \pm 0,002$	$0,0792 \pm 0,006$
cabeza	$0,2377 \pm 0,009$	$0,2330 \pm 0,004$	$0,2325 \pm 0,01$

Letras iguales indican medias estadísticamente significativas.

ción; ello permitió agrupar a los animales castrados con tratamiento en una zona del gráfico donde la variable calcio es elevada.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la concentración mineral ósea mediante densitometría en ratas ovariectomizadas y tratadas con estrógeno–progesterona⁵. En cambio, otros investigadores hallaron que en ratas con retroversión uterina el contenido mineral óseo y la densidad mineral ósea estaban disminuidos²⁶. Similares resultados fueron encontrados en algunos estudios efectuados sobre el contenido mineral óseo tanto en ratas ovariectomizadas como en machos tratados con parathormona³⁰. Otros autores sostienen que el grado de osteopenia en ratas ocasionado por la ovariectomía no tiene relación con el nivel de calcio de la dieta ni con la eficacia en la absorción intestinal de calcio²². Los resultados aquí obtenidos difieren con los de trabajos donde se evaluaron los efectos sobre el contenido mineral óseo en ratas de edad avanzada sometidas a restricción alimentaria y con suplementación de calorías con distintos porcentajes de grasa⁴⁰. Por otro lado, en la fase estrogénica del ciclo sexual en ratas

Wistar normotiroideas se verificaron incrementos de la calcemia y valores normales de Pi y FAL^{7,11}. Sabido es que el estrógeno potencia la respuesta de la vitamina D₃ en la absorción intestinal de calcio⁴². En ratas hipertiroideas se observó hiperfosfatemia e hipocalcemia, llevando a la ruptura del control homeostático de calcio y fósforo, con alteración de la microestructura ósea. Este mismo efecto fue anteriormente corroborado por nuestro grupo de trabajo mediante un analizador de imágenes, donde se observó un mantenimiento del espesor trabecular tibial de ratas castradas tratadas con estrógeno–progesterona⁶.

Los datos de densidad mineral ósea (DMO) se exponen en Tabla 1. Los valores fueron similares en los lotes castrados con y sin alendronato, arrojando diferencias significativas solo en las regiones lumbares ($p < 0,008$) e isquiofemorales ($p < 0,001$) respecto a los testigos; no hubo cambios de DMO en el resto de las regiones estudiadas.

El ANOVA reveló diferencias significativas entre medias de tratamientos, para las regiones lumbar e isquiofemorales derecha e izquierda. El Análisis Post–

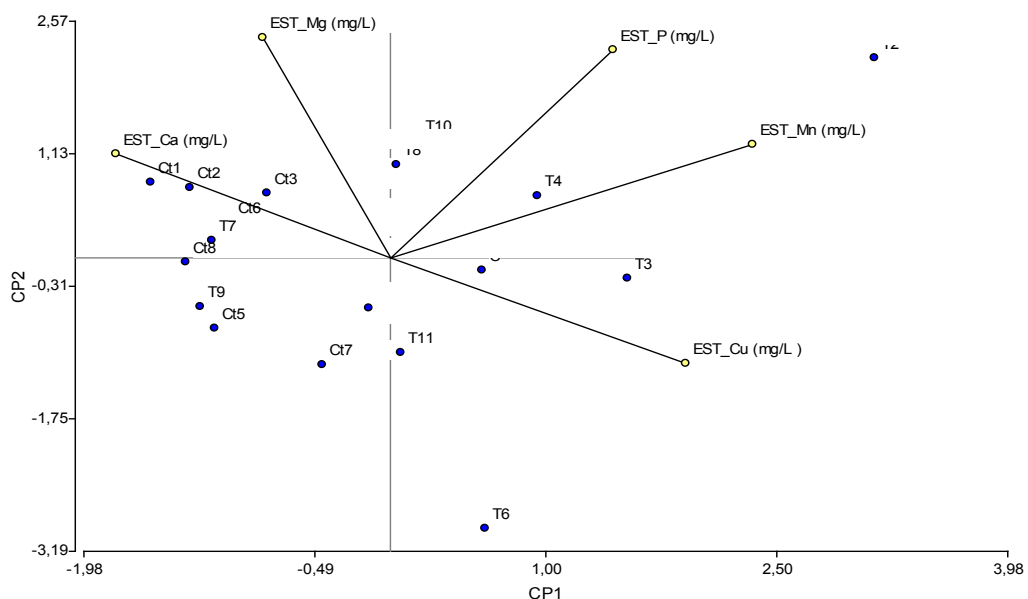


Figura 2. Análisis de componentes principales de las determinaciones minerales realizadas sobre el tejido óseo en los tres lotes bajo ensayo. CP1: componente principal 1, CP2: componente principal 2, EST: variables estandarizadas, t: ratas testigos, c: castradas, ct: castradas + alendronato. Cada cifra indica el número del animal.

ANOVA (test de Tukey) demostró que existieron diferencias significativas entre los animales testigos y las ratas castradas con y sin tratamiento con alendronato.

En conclusión, surge que en el modelo de osteoporosis experimental con ratas ovariectomizadas, el tratamiento semanal por vía oral con alendronato durante 8 meses no produjo variaciones significativas en las concentraciones minerales en sangre y tejido óseo, revelando ineficiencia para mantener una densidad mineral ósea normal.

Agradecimientos. A la Lic. María Emilia García Denegri por la valiosa colaboración prestada.

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. Bickerstaff DR, O'Doherty DP, McCloskey EV, Hamdy NA, Mian M, Kanis JA. 1991. Effects of amino-butylene diphosphonate in hipercalcemia due to malignancy. *Bone* 12: 17–20.
4. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, Rodríguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA. 2004. 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, 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 de la XXVI Sesión de Comunicaciones Científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, Corrientes (Argentina), comunicación N° 5.
6. Brem JJ, Trulls HE, Picot JA, Ortiz de Rus ML, Lorrente 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. Brommage R, Binacua C, Carrié AL. 1993. Ovulation-associated increase in intestinal calcium absorption during the rat estrous cycle is blunted by ovariectomy. *Biol Reprod* 49: 544–548.
8. Burr DB, Miller L, Grynpsas 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.
9. Chiappe Barbará MA. 2004. Mecanismos reguladores de la biología ósea, su importancia en la patogénesis de las osteopatías fragilizantes. *Med Vet* 85: 8–15.
10. Cointry GR, Cappozza RF, Ferretti JL, Frost HM. 2003. Hacia un diagnóstico antropométrico de las osteopenias y un diagnóstico biomecánico de las osteoporosis. *Medicina* 63: 737–747.
11. Cressent M, Elie C, Taboulet J, Moukhtar MS, Milhaud G. 1983. Calcium regulating hormones during the estrous cycle of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 158–162.
12. 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.
13. Fleish H. 1991. Bisphosphonates: pharmacology and use in the treatment of hypercalcemic ad metastatic bone disease. *Drugs* 42: 919–944.
14. Fleish, H. 1998. Bisphosphonates: mechanism of action. *J Clin Endocrinol Metab* 19: 80–100.
15. Frolik CA, Bryant HU, Black EC, Magee DE, Chandrasekhar S. 1996. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of Raloxifene HCl, Tamoxifen, Estrogen and Alendronate. *Bone* 18: 621–627.
16. Frost HM. 1993. Suggest fundamental concepts in skeletal physiology. *Calcif Tissue Int* 52: 1–4.
17. 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.
18. Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Freeman A, Quan H, Lasseter KC, Mucklow JC, Porras AG. 1995. Studies of bioavailability of alendronate. *Clin Pharmacol Ther* 58: 288–298.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Kanis JA. 1991. *Drugs used for the treatment of Paget's disease of bone*, Martin Dunitz, London, p. 139–216.
25. 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.
26. Lopez Castejon A, Revilla M, Hernández ER, Villa IF, Rico H, Cortes J. 1999. Effect of induced uterine retro-

- version on bone mass in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 83: 101–104.
27. **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.
 28. **McDowell LR, Conrad JH, Ellis GL, Loosli JK.** 1984. *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales*. Ed Cooperative Extensión Service, Inst of Food and Agric Sci, University of Florida, USA, 92 p.
 29. **Meunier PJ, Boivin G.** 1997. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. *Bone* 21:373–377.
 30. **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.
 31. **Mitruka BM, Rawnsley HM.** 1984. Guide to the care and use of experimental animals, *Can Council Anim Care* 1: 83–91.
 32. **Nishikawa M, Yamamoto M, Murakami T, Akatsu T, Kugai N, Nagata N.** 1998. A third–generation bisphosphonate, YM 175, inhibits osteoclast formation in murine cocultures by inhibiting proliferations of precursor cells via supporting cell–dependent mechanisms. *J Bone Min Res* 13: 986.
 33. **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.
 34. **Plotkin LI, Weinstein RS, Parffit AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T.** 1999. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104: 1363–1374.
 35. **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 an apoptosis–promoting kinase. *J Biol Chem* 274: 349–367.
 36. **Rico H, Roca–Botran C, Hernández ER, Seco C, Paez E, Valencia MJ, Villa LF.** 2000. The effect of supplemental copper on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Menopause* 7: 413–416.
 37. **Riggs BL.** 1991. Overview of osteoporosis. *West J Med* 154: 63–77.
 38. **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.
 39. **Rodan GA, Fleish HA.** 1996. Bisphosphonates: mechanism of action. *J Clin Invest* 97: 2692–2696.
 40. **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.
 41. **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.
 42. **Schwartz B, Smirnov P, Shany S, Liel Y.** 2000. Estrogen controls expression and bioresponse of 1,25–dihydroxyvitamin D receptors in the rat colon. *Mol Cell Biochem* 203: 87–93.
 43. **Sorensen OH, Crawford GM, Mulder H, Hosking DJ, Gennari C, Mellstrom D, Pack S, Wenderoth D, Cooper C, Reginster JY.** 2003. Long–term efficacy of risedronate: a 5 year placebo–controlled clinical experience. *Bone* 32: 120–126.
 44. **Zeni S, Gomez–Acotro C, Mautalen C.** 1997. Effect of olpadronate in ovariectomized thyroxine treated rats. *Bone* 21: 329–333.