



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

EFECTO DIFERENCIAL DEL ÁCIDO ZOLEDRÓNICO SOBRE EL HUESO TRABECULAR Y CORTICAL DE RATAS OVARIETOMIZADAS

Mercedes Lombarte, Lucas Ricardo Brun, María Lorena Brance, Florencia Bues, Verónica Elina Di Loreto*

Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Resumen

El ácido zoledrónico (AZ) es el bifosfonato de mayor potencia antirresortiva utilizado para el tratamiento de la osteoporosis. Sus efectos sobre el hueso trabecular son claros; contrariamente, sus efectos sobre el hueso cortical son motivo de controversia y poco conocidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del AZ sobre hueso trabecular y cortical de ratas ovariectomizadas (OVX) con osteoporosis. Para ello, 16 ratas Sprague Dawley hembras de 70 días fueron OVX. Ocho ratas fueron sometidas a cirugía simulada (Sham). Luego de 30 días, las ratas OVX recibieron AZ: 0,15 µg/100 g semana (OVX+AZ) o vehículo (OVX) por vía subcutánea. Al mes de tratamiento se determinó la densidad mineral ósea (DMO) de la tibia y, mediante histomorfometría, se evaluó el porcentaje de volumen óseo trabecular (%BV/TV). En el fémur se evaluaron parámetros estructurales corticales y las propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular. Resultados: el AZ incrementó la DMO en $7,71 \pm 2,17\%$ vs. OVX. En hueso trabecular se observó una disminución del %BV/TV en OVX, que se revirtió por el AZ (Sham: $31,2 \pm 3,43\%$; OVX: $13,7 \pm 1,68\%^*$; OVX+AZ: $27,4 \pm 2,98\%^*$; $p < 0,05$). La OVX dis-

minuyó la fuerza de fractura mientras que el AZ restableció parcialmente estos valores (Sham: $60,8 \pm 10,1$ N; OVX: $27,2 \pm 7,79^*$ N; OVX+AZ: $36,9 \pm 4,03$ N; $p < 0,05$). Ni la OVX ni el tratamiento con AZ modificaron las variables estructurales corticales de la diáfisis del fémur ni sus propiedades biomecánicas. Este trabajo muestra que el AZ produce efectos diferenciales sobre hueso trabecular y cortical: revierte la pérdida de masa ósea trabecular inducida por la OVX corrigiendo parcialmente su deterioro mecánico, a la vez que no modifica las propiedades del hueso cortical estudiadas. **Palabras clave:** ácido zoledrónico, osteoporosis, hueso trabecular, hueso cortical.

Summary

DIFFERENTIAL EFFECTS OF ZOLEDRONIC ACID ON TRABECULAR AND CORTICAL BONE IN OVARECTOMIZED RATS

Zoledronic acid (ZA) is the bisphosphonate of highest antiresorptive potency used in the treatment of osteoporosis. Its effects on trabecular bone are clear; on the other hand, its effects on cortical bone are controversial and

* Dirección electrónica: vediloreto@yahoo.com.ar

poorly understood. The aim of this work was to study the effects of ZA on trabecular and cortical bone in ovariectomized (OVX) rats with osteoporosis. For this, sixteen female Sprague Dawley rats of 70 days old underwent OVX. Eight rats were used as control of ovariectomy (Sham group). After 30 days, necessary for the development of osteoporosis, a group of OVX rats received 0.15 $\mu\text{g}/100\text{g}$ body weight/weekly of ZA (OVX+ZA) or vehicle (OVX) subcutaneously. One month after treatment, the % of trabecular bone volume (%BV/TV) was measured by histomorphometry and bone mineral density (BMD) of the tibia was determined. In the femur, cortical structural parameters and mechanical properties of the diaphysis and metaphysis were evaluated. Results showed that ZA increased BMD at $7.71 \pm 2.17\%$ compared with OVX. The % BV/TV was decreased by OVX and was reversed by ZA (Sham: $31.2 \pm 3.43\%$, OVX: $13.7 \pm 1.68\%*$, OVX+ZA: $27.4 \pm 2.98\%*$, $p < 0.05$). Ovariectomy decreased the fracture strength while treatment partially restored these values. (Sham: 60.8 ± 10.1 N, OVX: 27.2 ± 7.79 N*, OVX+ZA: 36.9 ± 4.03 N, $p < 0.05$). Neither ovariectomy nor treatment with zoledronic acid modified cortical structural variables of the femoral shaft and their biomechanical properties. This work shows that zoledronic acid produces differential effects on the trabecular and cortical bone: recovers the trabecular bone loss induced by ovariectomy and partially corrects the mechanical damage, while it does not change the studied properties on cortical bone.

Key words: zoledronic acid, osteoporosis, trabecular bone, cortical bone.

Introducción

La osteoporosis es una enfermedad metabólica del hueso caracterizada por una disminución de la masa ósea y deterioro progresivo de la microarquitectura del tejido, que evoluciona clínicamente de forma asintomática con aumento de la fragilidad del hueso y el consiguiente incremento del riesgo de fractu-

ra.¹ La resistencia a la fractura está determinada por la cantidad de hueso, por su diseño geométrico (tamaño, forma, conectividad de trabéculas) y por sus propiedades materiales. El tejido óseo está sometido constantemente al proceso de renovación conocido como remodelación ósea, en el cual la resorción y la formación óseas están acopladas de manera que la masa ósea permanece constante.² En la osteoporosis, la perturbación de este balance genera la osteopenia característica de la patología. La principal causa de osteoporosis en las mujeres es la menopausia, ya que la disminución de los niveles de estrógenos ocasiona la rápida pérdida de hueso debido a un aumento en la remodelación ósea donde la resorción excede a la formación.³

Los modelos animales desempeñan un papel importante para mejorar el conocimiento de la etiología, fisiopatología, diagnóstico, prevención y terapéutica de la osteoporosis. La ovariectomía (OVX) en ratas es el modelo animal de pérdida de masa ósea más utilizado y aceptado, ya que las características de dichas pérdidas son comparables a las que ocurren en la mujer posmenopáusica. En este modelo se observa un rápido aumento de la remodelación ósea luego de la OVX, lo cual lleva a un balance óseo negativo donde la resorción sobrepasa la formación.⁴ La pérdida ósea se observa alrededor del día 14 posovariectomía en el hueso trabecular de la tibia proximal y a los 90 días se alcanza una fase estable donde la resorción y la formación están balanceadas.⁵ Todos los cambios óseos se mantienen durante 12 meses.⁶ La osteopenia es más evidente en áreas trabeculares de la metafisis proximal de los huesos largos.⁷

Los bifosfonatos (BF) son drogas antirresortivas ampliamente utilizadas en la práctica clínica para el tratamiento de enfermedades con alta resorción ósea en adultos, principalmente osteoporosis, enfermedad de Paget y metástasis óseas de distintos tumores. También se utilizan en pacientes pediátricos con tumores óseos primarios, osteogénesis



imperfecta y osteoporosis secundarias a diferentes enfermedades y al uso de glucocorticoides.⁸ Estos compuestos son análogos estructurales del pirofosfato que se unen al mineral óseo con alta afinidad e inhiben la resorción ósea actuando sobre los osteoclastos.⁹ El ácido zoledrónico (AZ), un BF que contiene nitrógeno en su estructura, afecta la vía del mevalonato inhibiendo la enzima farnesil pirofosfato sintetasa con la consiguiente inhibición de la prenilación de proteínas.¹⁰ De esta manera, disminuye la adherencia del osteoclasto a la matriz ósea y aumenta su apoptosis.¹¹ El AZ es el BF de más reciente utilización para el tratamiento de la osteoporosis, es el que tiene mayor potencia antirresortiva y puede ser administrado menos frecuentemente debido a su mayor vida media y a la duración de su efecto.¹²

Los efectos de los BF sobre el hueso trabecular y el remodelado óseo son claros. Sin embargo, existen algunas controversias acerca de la calidad ósea principalmente en tratamientos a largo plazo.¹³ En cambio, los efectos de los BF sobre el hueso cortical y la formación ósea en la superficie periosteal son poco conocidos.^{14,15}

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del ácido zoledrónico sobre hueso cortical y trabecular de ratas ovariectomizadas con osteoporosis.

Materiales y métodos

Animales y procedimientos generales

Ratas hembra de 70 días de edad de la línea Sprague Dawley fueron sometidas a ovariectomía bilateral bajo anestesia de ketamina (50 mg/kg peso)-xilazina (5 mg/kg peso) intramuscular.¹⁶ Además, un grupo de ratas fueron sometidas a cirugía simulada constituyendo el grupo Sham como control del efecto de la OVX. Luego de la cirugía, los animales fueron alojados en jaulas colectivas, donde se mantuvieron sin tratamiento farmacológico durante 30 días con el fin de

que se desarrollara la osteoporosis. Tras ese período, se inició el tratamiento con AZ en la siguiente dosis y esquema: 0,15 $\mu\text{g}/100$ g de peso corporal vía subcutánea una vez a la semana.¹⁷ A los animales de los grupos control (Sham y OVX) se les suministró solución fisiológica vía subcutánea una vez por semana. Los grupos constituidos fueron: Sham, OVX y OVX+AZ (n=8 por grupo).

Después de 30 días de tratamiento se practicó la eutanasia de los animales y se extrajeron tibias y fémures.¹⁸ Las tibias derechas se fijaron en formol-*buffer* fosfato al 10%. Posteriormente fueron descalcificadas con EDTA al 10% e incluidas en parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 5 μm de espesor con un micrótopo (Leitz Wetzlab), los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron utilizados para las medidas histomorfométricas.

Las tibias izquierdas se secaron en estufa hasta que se registró un peso constante y su longitud fue medida con un calibre digital. Posteriormente se emplearon para las medidas densitométricas. Los fémures se conservaron en *freezer* a -20 °C en solución fisiológica para la realización de las pruebas biomecánicas y mediciones morfométricas del hueso cortical.

Se registró el peso corporal de los animales previo a la cirugía, antes del comienzo del tratamiento y al final del experimento.

Los animales fueron tratados de acuerdo con las normas internacionales aceptadas para el manejo de animales de laboratorio.^{19,20} Todos los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

Medidas densitométricas

Se determinó la densidad mineral ósea total (DMO) y el contenido mineral óseo (CMO) de las tibias izquierdas con un equipo de DXA (absorciometría de rayos X de energía dual) para pequeños animales (Hologic 1000). Los resultados se expresaron como porcentaje de variación de ambas variables.

Estudios histomorfométricos de hueso trabecular

Para la realización de las medidas histomorfométricas se efectuaron fotografías de los preparados histológicos de las tibias con una cámara digital (Olympus) adaptada a un microscopio (Mikoba). Se determinaron parámetros histomorfométricos estáticos a nivel del hueso esponjoso secundario de la tibia proximal: volumen de tejido total (TV), volumen óseo trabecular (BV), superficie ósea trabecular (BS). Con estos valores, se calcularon el porcentaje de volumen de hueso trabecular (%BV/TV), el espesor trabecular (Tb.Th, μm), el número de trabéculas (Tb.N, 1/mm) y la separación de las trabéculas (Tb.Sp, μm).²¹ Las medidas se llevaron a cabo a 1 mm en dirección distal del borde inferior del cartílago de crecimiento en un área de 2 mm² sobre las imágenes digitalizadas. Todas las mediciones se realizaron a ciego por el mismo operador y con el programa Image J 1.40 (National Institutes of Health, Maryland, USA).

Medidas morfométricas en hueso cortical

Para realizar el análisis morfométrico del hueso cortical se cortaron secciones transversales de 1,5 mm de espesor de la diáfisis del fémur (al 50% de la longitud total del hueso) con una sierra de baja velocidad (IsoMet, Buehler Ltd, Illinois, USA). Sobre imágenes digitales de las secciones transversales se realizaron las mediciones de las siguientes variables estructurales: área de la sección transversal y área medular, cuya diferencia permitió calcular el valor del área cortical; el diámetro perióstico (D) y el diámetro medular (d), los cuales se utilizaron para calcular el momento de inercia de sección transversal según la siguiente fórmula: $([D/2]^4 - [d/2]^4)\pi/4$.²²

Estudios biomecánicos

Para los estudios de competencia mecánica del hueso se utilizó un instrumento destinado a ensayos biomecánicos que cuenta con una celda de carga de 200 N de capacidad máxima, con

sensibilidad de 0,01 N. Las propiedades biomecánicas de la diáfisis femoral fueron evaluadas utilizando el ensayo de flexión a tres puntos. La fuerza se aplicó en la mitad de la diáfisis entre dos soportes ubicados a una distancia de 12 mm entre sí. Además, se evaluaron las propiedades biomecánicas del fémur distal a través de un ensayo de compresión, para lo cual se utilizó un corte transversal de 2,5 mm de espesor. La fuerza de compresión se aplicó con accesorio de punta plana circular de 2,5 mm de diámetro.^{23,24} En ambos casos, los ensayos fueron monitorizados con una computadora y un software que registró fuerza aplicada vs. desplazamiento para determinar las propiedades mecánicas óseas (Biomedical Data Acquisition Suite 1.0). Los parámetros analizados fueron: fuerza de fractura, fuerza máxima y rigidez del hueso.

Análisis estadístico

La comparación de los datos se realizó utilizando análisis de la variancia (ANOVA) a un criterio para datos independientes y prueba de Tuckey como postest para identificar diferencias entre las medias de cada grupo.

Para el peso corporal se utilizó ANOVA para datos apareados, postest de Tuckey. El porcentaje de variación de la DMO y el CMO se comparó con el 0% de variación utilizando t de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Peso corporal y tamaño del esqueleto

La Tabla 1 muestra que, al momento de la cirugía, el peso corporal de los animales no difirió entre los grupos. La OVX se asoció con un incremento del peso de los animales, el cual no fue modificado por el AZ.

Por otra parte, aunque la longitud de la tibia no difirió entre los grupos (Sham: 36,56 \pm 0,33 mm; OVX: 37,05 \pm 0,20; OVX+AZ: 36,98 \pm 0,18; $p > 0,05$), sí lo hizo el peso de dicho hueso, el cual disminuyó con la OVX. El tratamiento con AZ llevó el peso de la tibia a los valores del grupo



Tabla 1. Peso corporal (expresado en gramos) de los animales a lo largo del experimento (* $p < 0,05$ respecto a grupo Sham, ANOVA para datos apareados, posttest de Tuckey).

	Al momento de la cirugía	Inicio del tratamiento	Finalización del tratamiento
Sham	234,8 ± 3,17	311,3 ± 4,02	317,4 ± 8,42
OVX	243,8 ± 6,92	361,3 ± 8,06 *	359,3 ± 7,35 *
OVX+AZ	238,2 ± 2,58	352,1 ± 11,14*	358,6 ± 18,5 *

Sham (Sham: 116,5±3,07 mg/100g peso corporal; OVX: 99,63±3,20*; OVX+AZ: 111,1±2,64. ANOVA; posttest de Tuckey; $p < 0,05$).

Medidas densitométricas

Respecto de la densidad mineral ósea total (DMO) medida en la tibia por DXA, los resultados muestran que la OVX produce una disminución del 4,14±2,47% en relación con respecto al grupo Sham, consecuencia de la pérdida ósea asociada a la carencia de estrógenos. Luego de un mes de tratamiento con AZ, esta variable se incrementó significativamente 7,71±2,17% al comparar con el grupo OVX e incluso un 3,74±2,90% con el grupo Sham (vs. 0% de variación, t de Student, $p < 0,05$). De la misma manera, el tratamiento con AZ también produjo un incremento significativo del 8,18±2,49% del CMO respecto del grupo OVX (vs. 0% de variación, t de Student, $p < 0,05$).

Medidas histomorfométricas de hueso trabecular

Luego de 30 días de la OVX se observó una disminución en el %BV/TV como consecuencia de la carencia estrogénica (Figura 1). Esto se daría a expensas de una disminución del número de trabéculas más que de su grosor. El tratamiento con AZ recupera el volumen de hueso trabecular llevando los valores de %BV/TV, el número trabecular y la separación de las trabéculas al nivel de las ratas Sham (Figura 1 y Figura 2).

Medidas morfométricas de hueso cortical

No se observaron diferencias en las variables estructurales de la diáfisis del fémur (Tabla 2).

Medidas biomecánicas

La OVX disminuyó significativamente la fuerza de fractura, la fuerza máxima soportada por el hueso y la rigidez de la metáfisis distal del fémur (Tabla 3). El tratamiento con AZ durante 30 días no consiguió llevar estos valores a los del grupo Sham. Ni la OVX ni el tratamiento con AZ produjeron ningún efecto sobre las propiedades biomecánicas de la diáfisis femoral (Tabla 4).

Discusión

El presente estudio muestra un efecto diferencial del tratamiento con ácido zoledrónico sobre el hueso trabecular y cortical de ratas ovariectomizadas, que recupera la pérdida ósea trabecular inducida por la ovariectomía y sin efecto sobre el hueso cortical. Acorde con el modelo experimental utilizado, se observó que la OVX induce osteopenia trabecular cuatro semanas después de la cirugía.^{3,4} La OVX incrementa el remodelado óseo, lo cual produce pérdida de hueso trabecular. En forma similar a lo encontrado por otros autores, esta pérdida ósea resultaría de la remoción de trabéculas como lo demuestra la disminución del número de trabéculas y el incremento en la separación de estas.²⁵

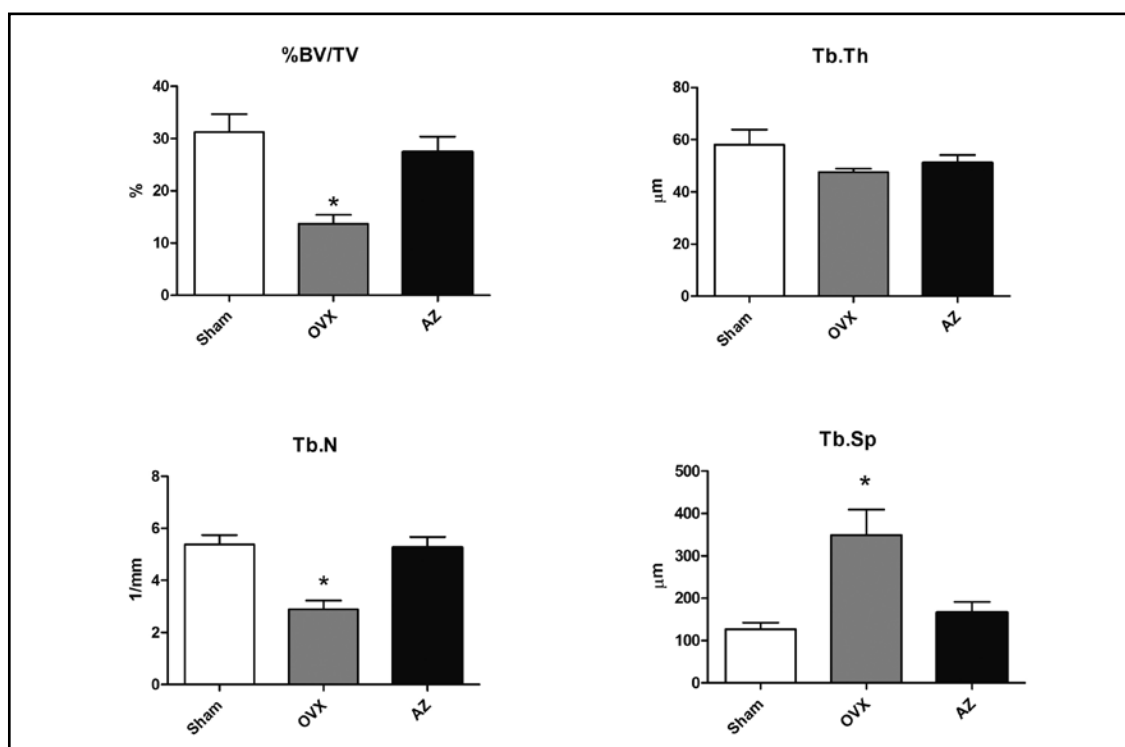


Figura 1. Variables histomorfométricas de hueso trabecular (Resultados expresados como media±EE. * Indica diferencia significativa con respecto a Sham y OVX+AZ, $p < 0,05$. ANOVA, posttest de Tuckey).

Tabla 2. Análisis de las variables estructurales de la diáfisis del fémur (media±EE ANOVA, $p > 0,05$).

	Sham	OVX	OVX+AZ
Área transversal, mm ²	10,40±0,45	10,70±0,42	11,00±0,55
Área medular, mm ²	4,14±0,41	3,67±0,20	4,08±0,33
Área cortical, mm ²	6,57±0,29	7,03±0,26	6,96±0,24
Diámetro perióstico, mm	3,60±0,05	3,49±0,10	3,40±0,10
Diámetro medular, mm	2,17±0,07	1,99±0,08	2,03±0,12
Momento de inercia, mm ⁴	8,05±0,61	8,08±0,62	8,43±0,74

También se observó disminución en la fuerza de fractura y la densidad mineral ósea.

Los bifosfonatos son altamente eficaces para incrementar la masa ósea y son los inhibidores de la resorción mediada por osteoclastos utilizados en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica y otras enfermedades de alto

catabolismo óseo. Según el presente trabajo, el ácido zoledrónico recupera la masa ósea perdida por efecto de la OVX estimada por el %BV/TV y la DMO. Sin embargo, en el test de compresión se observa que el tratamiento con AZ no alcanza a restablecer completamente las propiedades mecánicas estudiadas a pesar

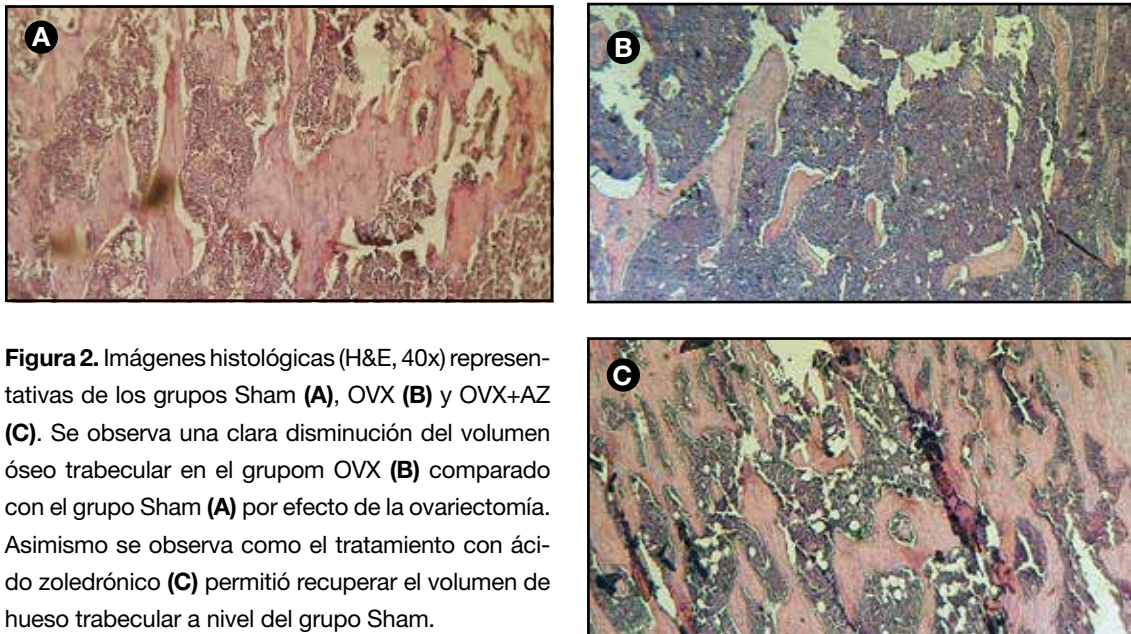


Figura 2. Imágenes histológicas (H&E, 40x) representativas de los grupos Sham **(A)**, OVX **(B)** y OVX+AZ **(C)**. Se observa una clara disminución del volumen óseo trabecular en el grupom OVX **(B)** comparado con el grupo Sham **(A)** por efecto de la ovariectomía. Asimismo se observa como el tratamiento con ácido zoledrónico **(C)** permitió recuperar el volumen de hueso trabecular a nivel del grupo Sham.

Tabla 3. Propiedades biomecánicas de la metáfisis distal del fémur (ensayo de compresión, media+/-EE, * $p < 0,05$ respecto a Sham, ANOVA, post test de Tuckey). *Abreviaturas: N = Newton*

	Sham	OVX	OVX+AZ
Fuerza fractura, N	60,8±10,1	27,2±7,79*	36,9±4,03
Fuerza máxima soportada, N	109,3±13,7	45,9±10,2*	66,9±13,6
Rigidez, N/mm	790±179	246±107	792±178

Tabla 4. Propiedades biomecánicas de la diáfisis del fémur (ensayo de flexión, media+/-EE, ANOVA, $p > 0,05$). *Abreviaturas: N = Newton*

	Sham	OVX	OVX+AZ
Fuerza fractura, N	165,9±8,99	166,3±5,03	168,7±7,81
Fuerza máxima soportada, N	177,1±10,8	170,5±4,86	170,3±8,91
Rigidez, N/mm	414,7±81,6	395,1±29,4	442,5±32,0

del incremento encontrado en dichas variables. Perilli y cols. han demostrado que la administración de AZ a ratas con OVX preserva y recupera el volumen óseo trabecular, aunque el tratamiento se realiza en forma más temprana, las dosis utilizadas son mayores y no evaluaron las propiedades mecánicas del hueso.²⁵ El hecho de que no se recuperen completamente las propiedades mecánicas del hueso luego del tratamiento con AZ estaría indicando que su competencia mecánica no depende únicamente de la masa sino también de la calidad del material y del diseño óseo. Probablemente se necesite mayor tiempo de tratamiento para recuperar completamente la calidad ósea. Por otra parte, los BF al afectar el remodelado óseo podrían producir una acumulación significativa de microdaños, lo cual también comprometería la calidad ósea.²⁶ Diversas observaciones histopatológicas realizadas en nuestro laboratorio podrían explicar estos hallazgos, ya que un análisis del hueso subcondral de la tibia proximal del grupo tratado con AZ muestra un hueso esponjoso desorganizado y con trabéculas anastomosadas entre sí que dan al hueso una apariencia de placa y con grandes remanentes de cartílago calcificado, lo cual es más evidente en la zona del hueso esponjoso primario (datos no publicados). Esto podría indicar una alteración en la osificación normal del hueso que afectaría su calidad. Varios estudios en curso a nivel del hueso esponjoso primario y del cartílago de crecimiento permitirán avalar esta hipótesis.

Existen datos contradictorios acerca de los

efectos de los BF sobre el hueso cortical y el proceso de aposición perióstica. Gasser y cols. encuentran un efecto protector sobre el hueso cortical que previene el deterioro mecánico, pero el estudio es realizado a más largo plazo, con dosis elevadas de AZ, y administrado al mismo tiempo en el que se efectúa la OVX.²⁷ En el presente trabajo, el AZ no parecería ejercer ningún efecto sobre las variables corticales ni en las propiedades mecánicas determinadas en este ensayo, demostrando que no produciría efectos sobre el hueso cortical al menos en las dosis y tiempos estudiados. Tampoco se encontraron diferencias significativas en las variables morfológicas corticales ni en el test de flexión entre OVX y Sham, lo que concuerda con la literatura, donde se muestra que el hueso cortical de las ratas no sería muy sensible a la OVX.³

En conclusión, el presente diseño experimental demuestra que el AZ tiene efectos diferenciales sobre el hueso trabecular y el hueso cortical: revierte la pérdida de masa ósea trabecular inducida por la OVX sin corregir completamente el deterioro de las propiedades mecánicas, a la vez que no modifica las propiedades del hueso cortical estudiadas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: septiembre 2014.
Aceptado: octubre 2014)

Referencias

1. Bonjour JP, Amman P, Rizzoli R. Importance of preclinical studies in the development of drugs for treatment of osteoporosis: a review related to the 1998 WHO guidelines. *Osteoporos Int* 1999; 9:379-93.
2. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:191-220.
3. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Inv* 2005, 115:3318-25.



4. Kalu DN. The ovariectomized rat model for postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15:175-92.
5. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Med* 2008; 58:424-30.
6. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995; 17:125S-33S.
7. Millar SC, Bowman BM, Jee SS. Available animal models of osteopenia – small and large. *Bone* 1995; 17:117S-23S.
8. Bachrach L, Ward L. Clinical Review: Bisphosphonate Use in Childhood Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:400-9.
9. Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 2002; 4:30-4.
10. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonate. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 269:235-42.
11. Fisher JE, Rodan GA, Reszka AA. In vivo effects of bisphosphonates on the osteoclast mevalonate pathway. *Endocrinology* 2000; 141:4793-6.
12. Green JR, Rogers MJ. Pharmacologic profile of zoledronic acid: a highly potent inhibitor of bone resorption. *Drug Dev Res* 2002; 55:210-24.
13. Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* 2001; 28:524-31.
14. Shahnazari M, Yao W, Dai W, et al. Higher doses of bisphosphonates further improve bone mass, architecture, and strength but not the tissue material properties in aged rats. *Bone* 2010; 46:1267-74.
15. Feher A, Koivunemi A, Koivunemi M, et al. Bisphosphonates do not inhibit periosteal bone formation in estrogen deficient animals and allow enhanced bone modeling in response to mechanical loading. *Bone* 2010; 46:203-7.
16. Di Loreto VE, Pera LI, Rigalli A. Ovariectomy. In: Rigalli A, Di Loreto VE (eds). *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Boca Raton, Florida: CRC press, 2009, p. 149-51.
17. Glatt M. The bisphosphonate zoledronate prevents vertebral bone loss in mature estrogen-deficient rats as assessed by micro-computed tomography. *Eur Cell Mater* 2001; 1:18-26.
18. Rigalli A. Euthanasia. In: Rigalli A, Di Loreto VE (eds). *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Boca Raton, Florida: CRC press, 2009, p. 31-2.
19. Canadian Council Animal Care Guidelines, Guide to the care and use of experimental animal. Vol 1, 2nd edition (1993). <http://www.ccac.ca>
20. Guide for the care and use of laboratory animals, National Institutes of Health, USA; publication N° 25-28, revised in 1996.
21. Parfitt AM, Drezner MK, Kanis JA, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Min Res* 1987; 2:595-10.
22. Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, et al. Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med* 2003; 349:327-34.
23. Brance ML, Brun LR, Di Loreto VE, Lupo M, Rigalli A. Sequential treatment with monofluorophosphate and zoledronic acid in osteoporotic rats. *Climacteric* 2014; 17:478-85.
24. Hogan HA, Ruhmann SP, Sampson HW. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2000; 15:284-92.
25. Perilli E, Le V, Ma B, Salmon P, Reynolds K, Fazzalari NL. Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporos Int* 2010; 21:1371-82.
26. Chapurlat RD, Delmas PD. Bone microdamage: a clinical perspective. *Osteoporos Int* 2009; 20:1299-308.
27. Gasser JA, Ingold P, Venturiere A, Shen V, Green JR. Long-term protective effects of zoledronic acid on cancellous and cortical bone in the ovariectomized rat. *J Bone Miner Res* 2008; 23:544-51.