

O ZOLEDRONATO NO TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE UMERAL EM RATAS. ESTUDO PROSPECTIVO E RANDOMIZADO

ZOLEDRONATE FOR TREATMENT OF HUMERAL OSTEOPOROSIS IN FEMALE RATS.
A PROSPECTIVE RANDOMIZED TRIAL

EVANDRO PEREIRA PALACIO¹, EDUARDO MARTINELLI JACOB¹, THIAGO BALTHAZAR CAMPI¹, SÉRGIO SWAIN MÜLLER²

RESUMO

Objetivo: Investigar as repercussões clínicas, biomecânicas e histomorfométricas do zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas osteoporóticas. Métodos: Analisou-se, prospectivamente, 40 ratas (*Rattus norvegicus albinus*). Com 60 dias de vida, foram aleatorizadas em dois grupos de acordo com o procedimento cirúrgico: ooforectomia bilateral (O) (n=20) e pseudo-cirurgia (P) (n=20). Após trinta dias, os animais foram novamente randomizados, de acordo com a administração de 0,1mg/kg de zoledronato (AZ) ou água destilada (AD): OAZ (n=10), OAD (n=10), PAZ (n=10) e PAD (n=10). Após doze meses, os animais foram eutanasiados e seus úmeros retirados. Clinicamente considerou-se o peso dos animais; biomecânicamente foram realizados ensaios compressivos e histomorfometricamente foi determinada a área trabecular óssea. Resultados: Os grupos "O" tiveram um aumento de peso maior que os grupos "P" ($p=0,005$). Os grupos com zoledronato suportaram maior carga máxima que os grupos com água destilada ($p=0,02$). Nos grupos com zoledronato verificou-se o aumento da área trabecular óssea quando comparados aos grupos com água destilada ($p=0,001$). Houve correlação positiva entre a área trabecular e a carga máxima ($p=0,04$; $r=0,95$). Conclusão: O zoledronato não influenciou no peso dos animais. Os resultados mostraram o aumento da resistência óssea umeral e da área trabecular óssea.

Descritores: Osteoporose. Menopausa. Terapêutica. Biomecânica.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the clinical, biomechanical and histomorphometric effects of zoledronate in the humerus of ovariectomized rats. Methods: Forty female rats (*Rattus norvegicus albinus*) were prospectively evaluated. Within 60 days, animals were randomized into two groups: ovariectomy (O) (n=20) or sham surgery (P) (n=20). Within 90 days, groups "O" and "P" were subdivided into four groups, according to the administration of zoledronate (AZ) or deionized water (AD): OAZ (n=10), OAD (n=10), PAZ (n=10) and PAD (n=10). Within 15 months, animals were sacrificed. Body weight was used for clinical study, axial compression tests for the biomechanical study and cancellous bone area for the histomorphometric study. Results: Ovariectomized groups had greater body weight gain than the sham groups ($p=0.005$). Zoledronate groups had greater body weight gain compared to the deionized water groups ($p=0.68$). Maximum load support was greater in the groups treated with zoledronate ($p=0.02$). An increase in cancellous bone area was noted in the groups treated with zoledronate ($p=0.001$). A positive correlation was shown in the evaluation of cancellous area and maximum load ($p=0.04$; $r=0.95$). Conclusions: Zoledronate had no effect on animals' body weight. Groups treated with zoledronate had increased maximum load support and cancellous bone area.

Keywords: Osteoporosis. Menopause. Therapeutics. Biomechanics.

Citação: Palacio EP, Jacob EM, Campi TB, Muller SS. O zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas. Estudo prospectivo e randomizado. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010; 18(2):90-5. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>

Citation: Palacio EP, Jacob EM, Campi TB, Muller SS. Zoledronate for treatment of humeral osteoporosis in female rats. A prospective randomized trial. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010; 18(2):90-5. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>

INTRODUÇÃO

A osteoporose é definida como uma desordem do tecido ósseo, caracterizada pelo comprometimento de sua resistência física. Trata-se, na realidade, de uma doença metabólica, em que ocorre perda gradual da massa óssea, com conseqüente deterioração de sua microarquitetura,¹ aumentando o risco de fraturas.

A homeostase óssea é o principal mecanismo de balanço e renovação deste tecido. Na fase de crescimento, o balanço desta renovação é positivo, equilibra-se na maturidade e, após os 40

anos, em média, passa a ser negativo. A perpetuação deste balanço negativo aos longos dos anos é o principal responsável pela osteoporose primária. O advento da menopausa acelera esta reciclagem metabólica negativa, causando a chamada osteoporose pós-menopáusicas. Em média, aos 65 anos, a mulher já perdeu cerca de 25% da massa óssea.^{2,3} Estudos estimam que, nos Estados Unidos, os custos gerados por fraturas decorrentes da osteoporose giram em torno de 12,6 bilhões de dólares/ano.⁴ Como em todas as áreas médicas, o tratamento da osteoporose

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1 – Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Marília/Famema – Marília. SP

2 – Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Botucatu/Unesp – Botucatu. SP

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu. UNESP Botucatu.SP.

Endereço para correspondência: Faculdade de Medicina de Marília/Famema, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Rua Monte Carmelo, 800. Fragata, 17519-030, Marília. SP, Brasil. Email: palacio@famema.br

Trabalho recebido em 06/11/08 aprovado em 26/04/09

apresenta uma característica muito mais preventiva que curativa, através, principalmente, de mudança de hábitos de vida e de atividade física. Contudo, anualmente, a indústria farmacêutica oferece grandes variedades de medicamentos para o tratamento desta enfermidade, como os bisfosfonatos, substâncias que aumentam a massa óssea, ou antes, diminuem sua reabsorção. Muitos também são os efeitos adversos causados pela administração contínua destes fármacos, o que diminui, em grande escala, a adesão dos pacientes ao tratamento.

Com base em tais informações, objetivou-se com este estudo, analisar os efeitos do zoledronato, uma nova e poderosa droga anti-reabsortiva, em dose única anual, em úmeros de ratas ooforectomizadas, através de estudos clínicos, biomecânicos e histomorfométricos.

MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal sob o nº 622/2007. Foram utilizadas 40 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, sexualmente maduras e virgens, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) - Campus de Botucatu.

Os animais, à recepção, depois de clinicamente avaliados e pesados, foram alojados em grupos de cinco, em oito gaiolas de polipropileno com tampa de grade de metal e forradas com maravalha de pinho autoclavada. Estas eram limpas diariamente e mantidas em local seco e arejado, com temperatura ambiente controlada em 24° C e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. Foi oferecido aos animais ração para roedores (Labina®, Nestlé Purina PetCare Company®) e água *ad libitum*.

Aos 60 dias de vida, após atingirem a maturidade sexual, foram identificados, através de perfurações na região auricular direita e esquerda, e aleatorizados, pelo método de sorteio de envelopes opacos lacrados, em dois grupos de acordo com o procedimento cirúrgico a que seriam submetidos: grupo ooforectomia (O) (n=20) e grupo pseudo-cirurgia ("sham") (P) (n=20).

O procedimento de castração foi realizado após anestesia, intraperitoneal, com 30 mg/kg de pentobarbital sódico 3%, e tricotomia, bilateral, logo abaixo da última costela, dorso-lateralmente. Foram submetidos à assepsia com água e sabão, anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodo tintura (PVPI-tintura) e posicionados em mesa cirúrgica, em decúbito lateral. Após a colocação de campo estéril ocular, foi realizada uma incisão transversal na pele de, aproximadamente, 1,5 centímetros de comprimento, entre a última costela e a articulação coxofemoral. Com auxílio de uma pinça, a cavidade peritoneal foi exposta, ultrapassando o plano muscular por divisão, permitindo acesso ao ovário envolto em tecido adiposo. (Figura 1) Procedeu-se à ligadura do ovário com fio de algodão 3.0 e secção do mesmo distalmente à ligadura. A musculatura e a pele foram



Figura 1 – Aspecto do pinçamento do ovário em meio ao tecido adiposo antes de sua ligadura e secção.

aproximadas com fio de nylon 4.0, repetindo-se os mesmos procedimentos no lado contralateral para retirada do outro ovário. Os animais do grupo P foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos descritos, com exceção do tempo cirúrgico de ligadura e secção dos ovários.

Aos 90 dias de vida e após nova aleatorização, os grupos "O" e "P", foram subdivididos em quatro subgrupos de acordo com a administração, intraperitoneal, de 0,1mg/kg^{5,6} de zoledronato (AZ) (Aclasta™, Novartis® Biociências S.A.) ou água destilada (AD), assim: OAZ (n=10), OAD (n=10), PAZ (n=10) e PAD (n=10). Para administração das substâncias utilizou-se seringa estéril para insulina, com agulha fixa, marca Injex Stilly Line® (1ml/cc, agulha 12,7mm x 0,30 – 30G 1/2’’).

Doze meses após a administração do zoledronato ou água destilada, os animais foram eutanasiados, com dose letal, intraperitoneal, de 80mg/kg de pentobarbital sódico 3%.

Após a eutanásia, os úmeros dos animais foram desarticulados na região proximal (ombro) e distal (cotovelo), com a retirada das partes moles (músculos, tendões e ligamentos). Para o ensaio biomecânico, os úmeros direitos foram embalados em papel alumínio, identificados e congelados por 24 horas, em refrigerador doméstico, à temperatura de -20°C. Os úmeros esquerdos foram acondicionados em recipientes de vidro, limpos e devidamente identificados, e fixados em solução de formaldeído 10%, para a realização do estudo histomorfométrico.

Estudo clínico

O estudo clínico foi realizado através da análise da massa corpórea dos animais (g). As medições foram realizadas mensalmente e sempre no mesmo dia, durante todo o experimento, utilizando-se balança digital com capacidade de seis quilogramas-força e variação de cinco gramas. A aferição da balança era realizada trimestralmente por pessoal técnico.

Estudo biomecânico

Para determinação das propriedades mecânicas dos úmeros, foram realizados ensaios de compressão axial, utilizando-se a Máquina Universal de Ensaio Mecânicos EMIC, modelo DL 10.000, com precisão de (0,018 + F/3700)KN, apurada dentro das especificações das normas ABTN, NBR6156 e NBR6674. A máquina, que opera em conjunto com computador sob o sistema operacional Windows™ 2000, utiliza o programa Mtest versão 1.00 para aferição dos resultados. Doze horas antes do ensaio biomecânico, os úmeros direitos foram descongelados e mantidos em compressas embebidas em soro fisiológico 0,9%.

As extremidades distais dos úmeros foram fixadas verticalmente, em recipientes de plástico, com capacidade de 35 ml, contendo 25 ml de resina acrílica auto-polimerizante (Jet®). Após 2 horas, as peças foram enviadas para os testes biomecânicos. O cutelo, cuja extremidade é côncava, foi posicionado axialmente ao úmero, ajustando-se, perfeitamente, à sua cabeça. (Figura 2) Para determinação da carga máxima suportada pelo corpo, o cutelo foi posto em movimento a uma velocidade de 30mm/min^{7,8} O cálculo da carga máxima foi realizado automaticamente pelo programa. (Figura 3)

Estudo histomorfométrico

Os úmeros esquerdos, após descalcificação, desidratação, diafanização e inclusão em parafina, foram cortados transversalmente na área metafisária proximal (colo cirúrgico) e corados por Hematoxilina-Eosina (HE).⁹ As lâminas foram colocadas em microscópio (Laica®) acoplado a monitor de vídeo com resolução de 1024x768 pixels, que enviava as imagens digitais a um computador. A área de osso trabecular (μm^2) foi calculada utilizando-se a objetiva de 5X e o programa de análise de imagens Image Pro plus (Media



Figura 2 – Detalhe do corpo de prova em repouso e do cutelo de aplicação de carga, posicionado axialmente à cabeça umeral.

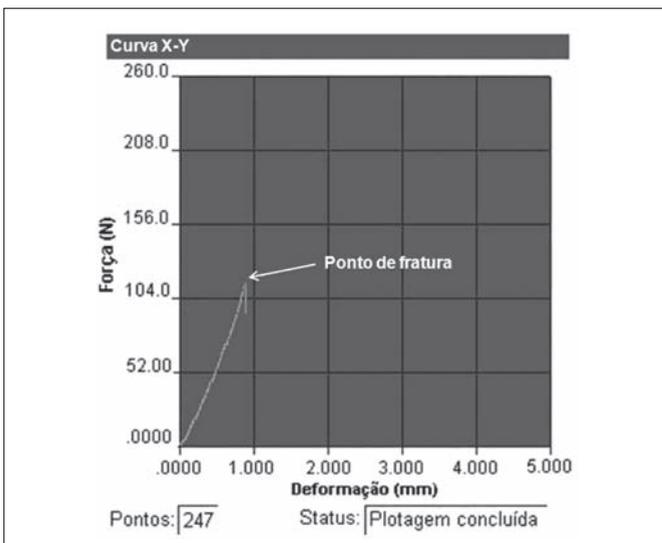


Figura 3 – Diagrama carga-deformação obtido durante o ensaio de compressão axial.

Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA), em dois campos padrões da região central do colo cirúrgico umeral, após delimitação manual do perímetro das trabéculas. (Figura 4) O cálculo da área total foi realizado automaticamente pelo programa.¹⁰

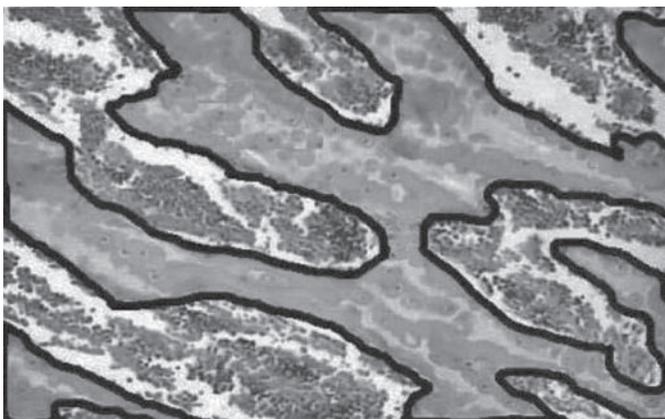


Figura 4 – Aspecto do corte histológico transversal do colo cirúrgico umeral (HE, 20X), após delimitação manual do perímetro das trabéculas.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através de análise de variância (paramétrica ou não-paramétrica), no modelo inteiramente casualizado, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas, utilizando-se, para tanto, os programas SigmaStat® versão 3.5 (Systat Software Inc., 2006) e Minitab® versão 15 (Minitab Inc., 2007). A opção paramétrica acontecia quando a variável apresentava comportamento gaussiano (teste *t* de Student, teste ANOVA associado ao teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak, e o teste de correlação de Pearson), caso contrário, indicava-se a opção não-paramétrica (teste *U* de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn). Para todos os cálculos foram utilizados nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Análise clínica

No geral, todos os grupos aumentaram a massa corpórea independente da substância administrada sem, contudo, diferença significativa ($p=0,05$). (Figura 5) O aumento da massa corpórea foi significativamente maior nos animais ooforectomizados ($p=0,005$). (Figura 6) Levando-se em consideração a substância administrada, verificou-se, dentro do grupo O, que o grupo que recebeu zoledronato (OAZ) aumentou mais a massa corpórea que o grupo que recebeu água destilada (OAD), não havendo, contudo, diferença estatística ($p=0,47$). (Figura 7) O mesmo se deu em relação ao grupo pseudo-cirurgia (P) ($p=0,68$). (Figura 8)

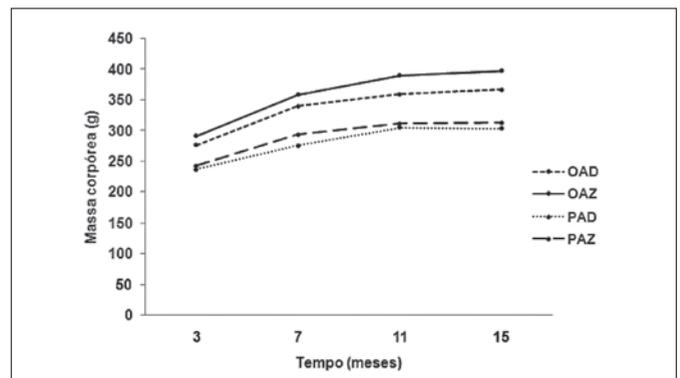


Figura 5 – Média da massa corpórea dos grupos ao longo do experimento ($p=0,05$).

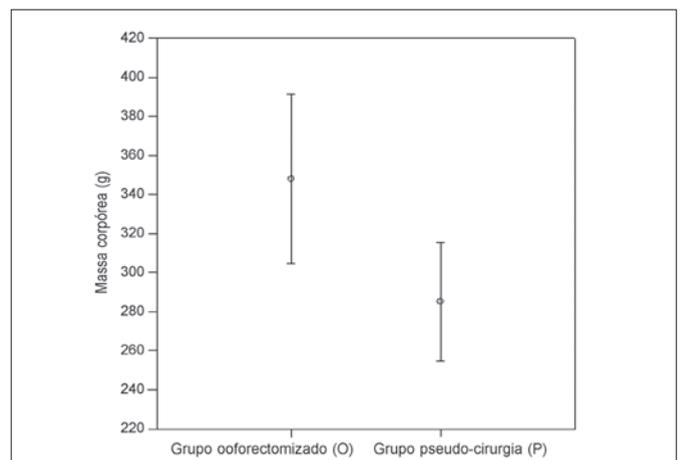


Figura 6 – Média da massa corpórea dos grupos "O" e "P" ao longo do experimento ($p=0,005$).

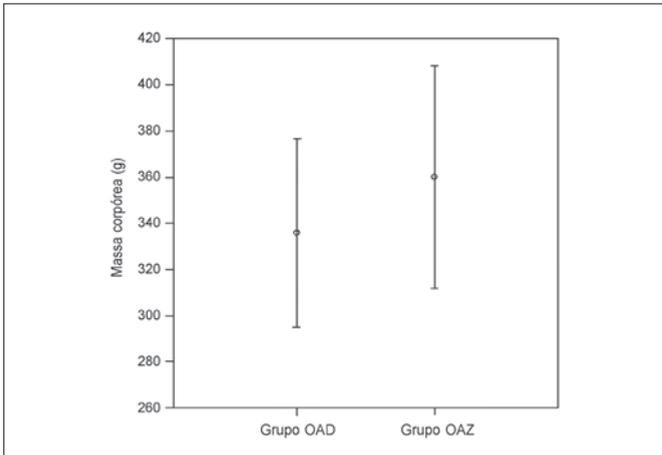


Figura 7 – Média da massa corpórea nos grupos OAD e OAZ ao longo do experimento ($p=0,47$).

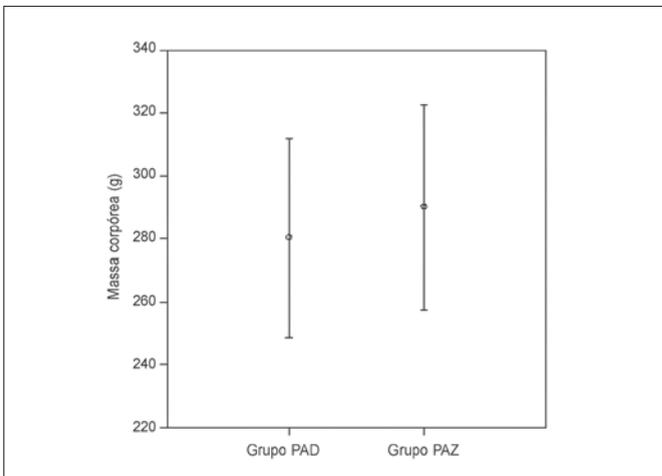


Figura 8 – Média da massa corpórea nos grupos PAD e PAZ ao longo do experimento ($p=0,68$).

Análise biomecânica

Ao se comparar os quatro grupos, observou-se que aqueles que fizeram uso do zoledronato suportaram força de compressão estatisticamente maior que os que não o utilizaram ($p=0,02$). (Figura 9)

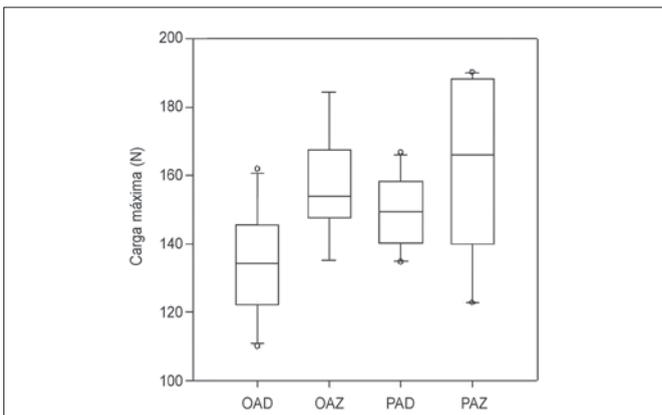


Figura 9 – Box plot da mediana de carga máxima no momento da fratura nos diferentes grupos ($p=0,02$).

A média da carga máxima suportada do grupo OAD ($133,9N \pm 14,2$) foi estatisticamente menor que a do grupo OAZ ($156,5N \pm 14,9$) ($p=0,005$). (Figura 10) Quando se comparou a média da carga máxima nos grupos OAD ($133,9 \pm 15,4$) e PAD ($149,7 \pm 10,3$), verificou-se diferença significativa entre as mesmas ($p=0,01$) (Figura 11). Por outro lado, a média da carga máxima suportada pelo grupo OAZ ($156,5 \pm 14,9$) foi, estatisticamente, a mesma do grupo PAD ($149,6 \pm 9,8$) ($p=0,25$). (Figura 12)

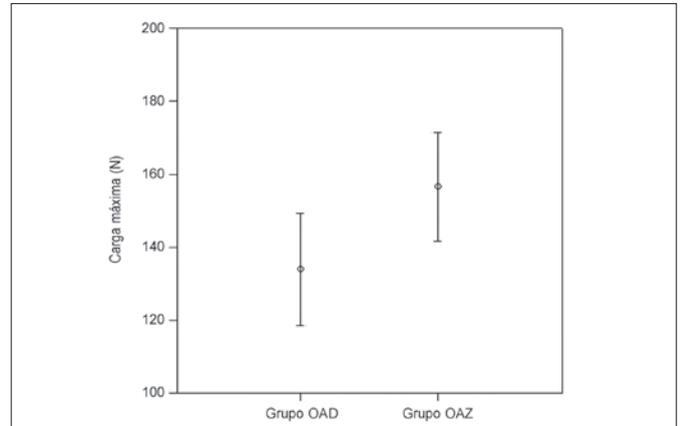


Figura 10 – Média da carga máxima no momento da fratura nos grupos OAD e OAZ ($p=0,005$).

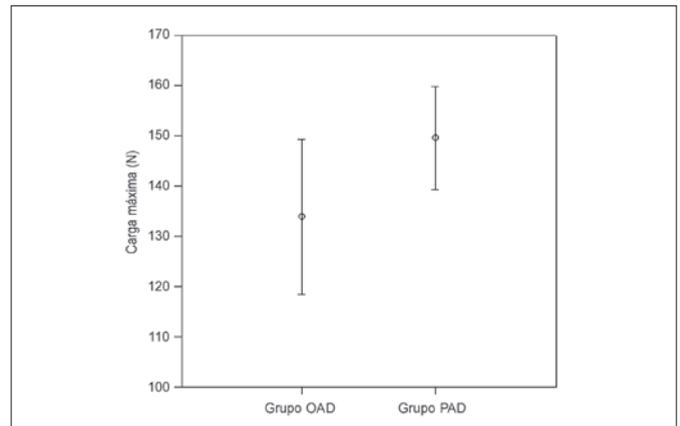


Figura 11 – Média da carga máxima no momento da fratura dos grupos OAD e PAD ($p=0,01$).

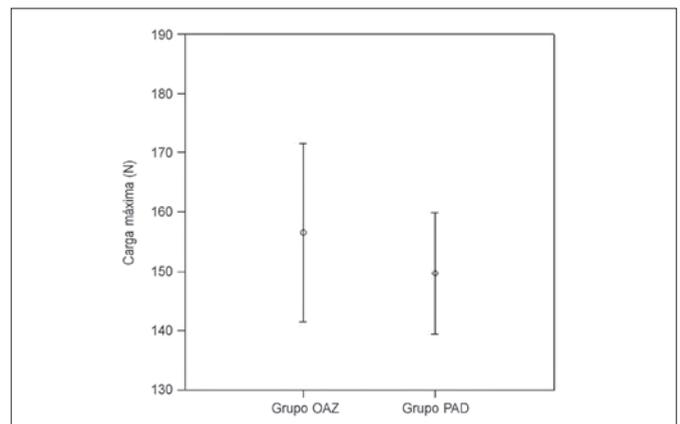


Figura 12 – Média da carga máxima no momento da fratura nos grupos OAZ e PAD ($p=0,25$).

Análise histomorfométrica

Ao se comparar os quatro grupos, verificou-se o aumento significativo da mediana da área óssea trabecular nos grupos que fizeram uso do zoledronato ($p=0,001$). (Figura 13)

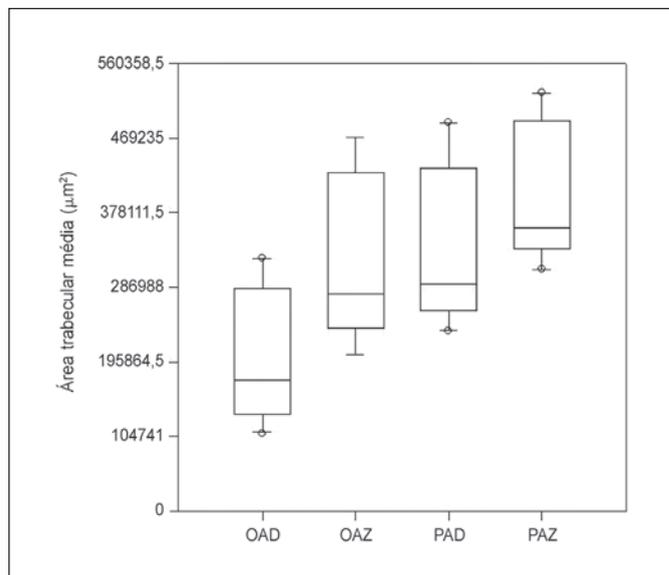


Figura 13 – Box plot da mediana da área óssea trabecular nos diferentes grupos ($p=0,001$).

Houve diferença significativa ao se comparar a área trabecular média umeral dos grupos OAD ($202448 \mu\text{m}^2 \pm 86247$) e OAZ ($334785,2 \mu\text{m}^2 \pm 111205$) ($p=0,01$). (Figura 14) Ao se comparar as medianas dos grupos OAD (175978,5) e PAD (304468), verificou-se diferença significativa entre as mesmas ($p=0,01$) (Figura 15), paralelamente, verificou-se que o valor mediano da carga máxima suportada pelo grupo OAZ (290925) foi, estatisticamente, o mesmo do grupo PAD (304468) ($p=0,71$). (Figura 16)

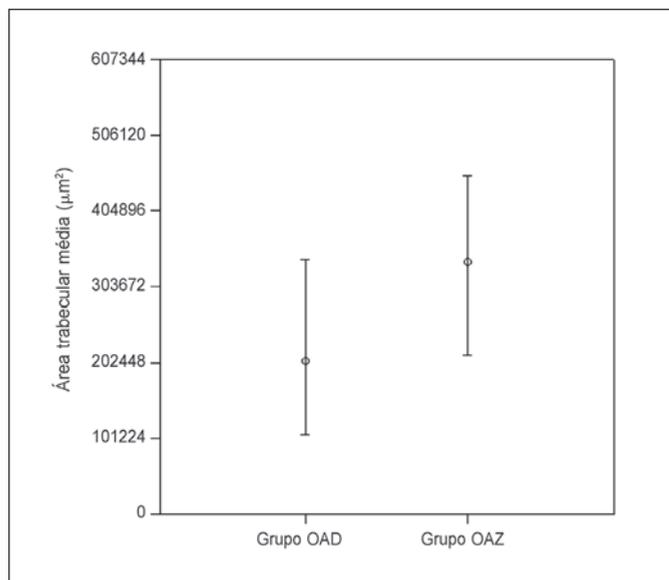


Figura 14 – Média da área óssea trabecular nos grupos OAD e OAZ ($p=0,01$).

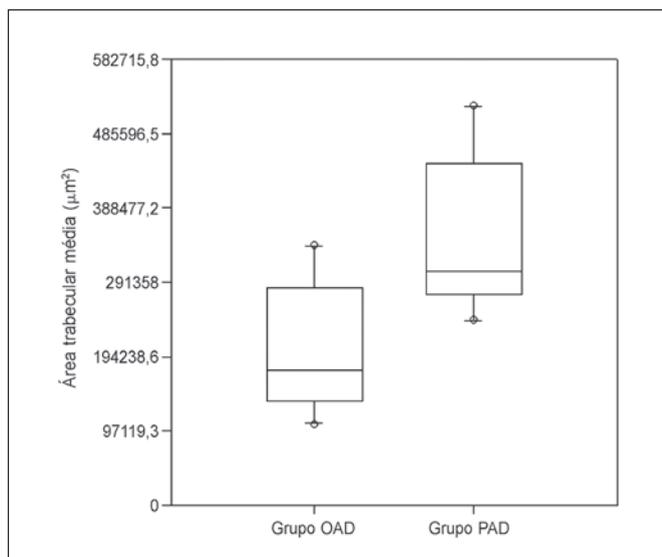


Figura 15 – Box plot da mediana da área óssea trabecular nos grupos OAD e PAD ($p=0,01$).

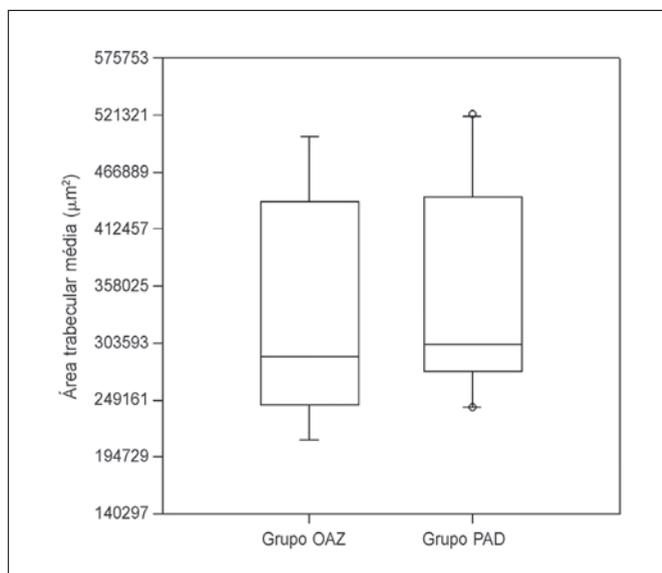


Figura 16 – Box plot da mediana da área óssea trabecular nos grupos OAZ e PAD ($p=0,71$).

Análise de regressão linear

O coeficiente de Pearson mostrou haver correlação positiva entre a área trabecular óssea e a carga máxima suportada pelo corpo de prova ($p=0,04$; $r=0,95$). (Figura 17)

DISCUSSÃO

A grande maioria das fraturas do úmero proximal ocorre em mulheres (3:1) após o climatério ou acima de 60 anos.¹¹ Estas correspondem ainda à quarta fratura mais freqüente na vigência de osteoporose, respondendo por 12% de todas as fraturas.^{12,13} Segundo Maravic *et al.*¹⁴, na França, cada fratura de úmero, de origem osteoporótica, gera custos anuais individuais em torno de US\$4.000. O zoledronato, que age inibindo a ação osteoclástica e, conseqüentemente, diminuindo a reabsorção óssea,¹⁵ pode ser utilizado na profilaxia das fraturas causadas pela osteoporose.

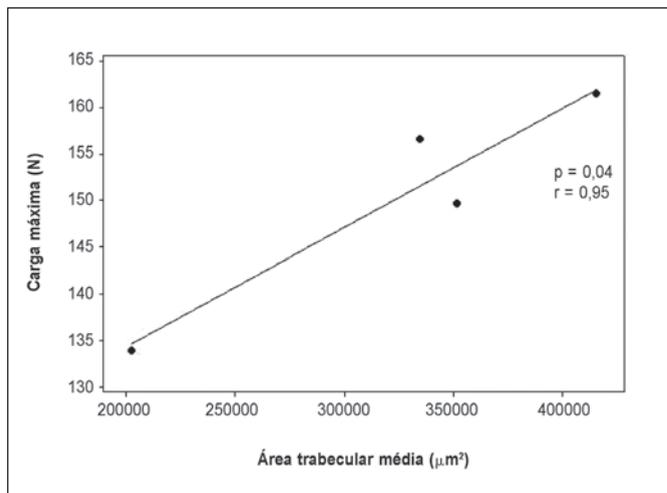


Figura 17 – Regressão linear entre a área trabecular óssea e a carga máxima ($p=0,04$)

Para a realização deste estudo, o rato foi escolhido por possuir características próximas às dos seres humanos, no que se refere aos sistemas músculo-esquelético e hormonal, além da facilidade de manuseio, disponibilidade em biotério e baixo custo.¹⁶

Em se tratando da massa corporal, os animais com privação de hormônio, ou seja, ooforectomizados (grupo O), apresentaram maior ganho de massa corporal que o grupo pseudo-cirurgia ("sham") (grupo P) ($p=0,005$). Achados semelhantes foram obtidos por diversos autores.^{17,18} Após o climatério, em função da alteração não apenas da distribuição de tecido adiposo, causado pela deficiência de estrógenos, mas também pelo acúmulo periférico de gordura, ocorre alteração do perfil lipídico e aumento da massa corporal.¹⁹ Não verificamos, neste estudo, a influência do zoledronato no aumento da massa corporal dos animais. Conclui-se, portanto, que o aumento da massa corpórea foi causado pela retirada dos ovários (ooforectomia) e não pelas substâncias administradas.

Com relação à análise biomecânica, ao se comparar a carga máxima suportada pelos úmeros nos quatro grupos, observou-se que os

grupos que fizeram uso do zoledronato apresentaram carga significativamente maior no momento de fratura, que os que não o utilizaram ($p=0,02$), mostrando que o zoledronato aumentou a resistência física do osso à fratura.^{6,20} Tais resultados se repetiram durante a análise dos grupos OAD e OAZ ($p=0,005$). A ausência de diferença significativa entre as cargas máximas dos grupos OAZ e PAD, reforça a tese de que o zoledronato agiu aumentando a resistência óssea à fratura, em nível superior ao do grupo não-castrado.

Histomorfometricamente, ao se comparar a área trabecular óssea nos quatro grupos, pôde-se observar que os grupos que fizeram uso do zoledronato apresentaram área óssea trabecular significativamente maior ($p=0,001$) que os que não o utilizaram. Analisando-se a área trabecular óssea dos grupos OAD e OAZ, verificou-se que a presença do zoledronato aumentou significativamente a área trabecular ($p=0,01$). Pathas *et al.*¹⁰ analisaram o efeito da ooforectomia na diáfise, metáfise e epífise óssea de ratas, observando a diminuição das trabéculas apenas na região metafisária. Concluíram que a ooforectomia exerce mudanças significativas no osso trabecular de ossos longos, principalmente nas extremidades e, em menor monta, na região média. O zoledronato, no presente estudo, proporcionou a manutenção das trabéculas ósseas na região umeral metafisária. Da mesma forma que no estudo biomecânico, o zoledronato manteve a área óssea trabecular no grupo castrado (OAZ) em nível estatisticamente igual ao do grupo não-castrado (PAD).

A análise de dispersão entre a área trabecular óssea e a carga máxima suportada pelo corpo, mostrou que estas são grandezas que se correlacionam positivamente, ou seja, a carga máxima suportada pelo úmero variou, proporcionalmente, à sua área trabecular. Portanto, a quantidade e a qualidade das trabéculas ósseas podem ser consideradas fatores preditivos para fraturas decorrentes da osteoporose.

CONCLUSÕES

O zoledronato não teve influência significativa na massa corpórea dos animais. A análise dos resultados mostrou que o zoledronato aumentou significativamente a resistência óssea do úmero proximal e a área trabecular óssea na região metafisária do úmero em ratas osteoporóticas. Outros estudos se fazem necessários para se evidenciar a eficácia do zoledronato em outras regiões umerais.

REFERÊNCIAS

- Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy JAMA. 2001;285:785-95.
- Carvalho MI. Osteoporose: visão do ortopedista. Rev Bras Ortop. 2006;41:91-7.
- Pinto Neto AM, Soares A, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B *et al.* Consenso brasileiro de osteoporose 2002. Rev Bras Reumatol. 2002;42:343-54.
- AAOS – American Academy of Orthopaedic Surgeons. The hip. Preventing hip fractures [AAOS report]. AAOS, 2001.
- Matos MA, Araújo FP, Paixão FB. Os efeitos do zoledronato na remodelação óssea durante o processo de reparação. Acta Cir Bras. 2007;22:115-9.
- Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. J Bone Miner Res. 2007;22:867-76.
- Smith BA, Livesay GA, Woo SL. Biology and biomechanics of the anterior cruciate ligament. Clin Sports Med. 1993;12:637-70.
- Smith EL, Raab DM. Osteoporosis and physical activity. Acta Med Scand. 1986-711(Suppl):149-56.
- Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 8a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1995.
- Patlas N, Zadik Y, Yaffe P, Schwartz Z, Ornoy A. Oophorectomy-induced osteopenia in rats in relation to age and time post-oophorectomy. Cells Tissues Organs. 2000;166:267-74.
- Bigliani LU, Craig EV, Butters KP. Fraturas do úmero proximal. In: Rockwood CA Jr, Green DP, Bucholz RW, editors. Fraturas em adultos. Tradução de Nelson Gomes de Oliveira. 3a. ed. São Paulo: Editora Manole; 1993. p.855-910.
- Löfman O, Hallberg I, Berglund K, Wahlström O, Kartous L, Rosenqvist AM *et al.* Women with low-energy fracture should be investigated for osteoporosis. Acta Orthop. 2007;78:813-21.
- Guggenbuhl P, Meadeb J, Chalès G. Osteoporotic fractures of the proximal humerus, pelvis, and ankle: epidemiology and diagnosis. Joint Bone Spine. 2005;72:372-5.
- Maravic M, Le Bihan C, Landais P, Fardellone P. Incidence and cost of osteoporotic fractures in France during 2001. A methodological approach by the national hospital database. Osteoporos Int. 2005;16:1475-80.
- Amanat N, Brown R, Bilston LE, Little DG. A single systemic dose of pamidronate improves bone mineral content and accelerates restoration of strength in a rat model of fracture repair. J Orthop Res. 2005;23:1029-34.
- da Paz LH, Jorgetti V, Yoshinari NH. Modelos animais de osteoporose. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 1997;52:86-9.
- Cliquet Junior A, Carvalho DCL. Ação do ultra-som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. Acta Ortop Bras. 2003;11:17-24.
- Netto CC, Franco M, Cunha MSCA, Miyasaka CK. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. R Ci. Méd Biol. 2006;5:231-8.
- Dias R, Luca LA, Ramos MD, Antonini FR, Rudge MVC. Avaliação da atividade estrogênica após a menopausa. J Bras Ginecol. 1982;92:261-9.
- Hornby SB, Evans GP, Hornby SL, Pataki A, Glatt M, Green JR. Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adults rats. Calcif Tissue Int. 2003;72:519-27.