

COMPARAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS DE RATAS NORMAIS E OSTEOPÊNICAS

BONE REPAIR PROCESS IN NORMAL AND OSTEOPENIC FEMALE RATS' TIBIAE: A COMPARATIVE STUDY

ANGÉLICA ROSSI SARTORI¹, JULIETA APARECIDA MOREIRA², ANTONIO MARCOS MARTINS SANTOS³, DENNYS ESPER CORRÊA CINTRA⁴, LUCAS ROSSI SARTORI⁵, MÁRIO ANTÔNIO BARAÚNA⁶, ROBERTO SÉRGIO TAVARES CANTO⁷

RESUMO

O objetivo foi comparar a consolidação óssea em tíbias de ratas normais e osteopênicas. 49 ratas albinas fêmeas, linhagem Wistar, peso médio de 160 (± 20)g e 100 dias foram distribuídas em 2 grupos: Ooforectomizado (OOF) e Pseudo-ooforectomizado (Grupo controle - SHAM). 30 dias após a ooforectomia e/ou cirurgia simulada, todas foram submetidas à produção de lesão óssea cortical. Foram sacrificadas na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas. Os osteoblastos foram contados. O peso aumentou progressivamente, porém as OOF apresentaram maior peso ($p \leq 0,05$) quando comparadas as SHAM, à época da segunda cirurgia. 15 dias pós-lesão óssea, as OOF apresentaram maior número de osteoblastos ($p \leq 0,05$) quando comparados as SHAM. 30 dias pós-lesão óssea houve diminuição no número de osteoblastos, porém os valores foram equivalentes entre os dois grupos OOF e SHAM. 45 dias pós-lesão, apesar da diminuição constante de osteoblastos, o grupo OOF permaneceu elevado quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$). Aos 60 dias o grupo SHAM apresentou menos osteoblastos, sugerindo processo avançado de reparo ósseo. Os animais osteopênicos apresentaram resposta inicial acelerada à lesão óssea, possibilitando a equivalência entre os grupos 30 dias pós-lesão. Mas, após este período apresentaram retardo na mineralização do osteóide, sugerindo atraso tardio no processo de reparo ósseo.

Descritores: Osteoporose, Ovariectomia, Osteopenia.

Citação: Sartori AR, Moreira J, Santos AMM, Cintra DEC, Sartori LR, Baraúna MA, Canto RST. Comparação do processo de reparo ósseo em tíbias de ratas normais e osteopênicas. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2008; 16(1):37-40. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Osteoporose é definida como distúrbio osteometabólico, de origem multifatorial, caracterizado pela diminuição de densidade mineral óssea e deterioração de sua microarquitetura, com consequente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fraturas. No Brasil cerca de 10 milhões de pessoas são acometidas por essa doença e as fraturas são freqüentes^(1,2). Classificam-se em osteoporose primária pós-menopausa (Tipo I), Senil (Tipo II) e secundária⁽³⁾. O osso representa uma forma rígida de tecido conjuntivo que está em constante remodelação sendo, portanto, um tecido com elevada plasticidade. A forma e a densidade do tecido ósseo são

SUMMARY

The purpose was to compare tibial bone union in normal and osteopenic female rats. Forty-nine Wistar albino female rats weighing 160 g (± 20)g and 100 days were distributed into 2 groups: Oophorectomized (OOF) and Pseudo-oophorectomized (SHAM). Thirty days later, a cortical injury was produced in all the animals. They were sacrificed in the 2nd, 4th, 6th and 8th weeks. Osteoblasts count was performed. Progressive weight increase was observed, but the OOF group was shown to have gained more weight ($p \leq 0.05$) than the SHAM group, at the time of the second surgery. After 15 days post-injury, the animals in the OOF group presented a higher number of osteoblasts ($p \leq 0.05$) compared to the SHAM group. Thirty days after injury, the number of osteoblasts was reduced, but both groups showed similar amounts. Forty-five days after injury, despite a constant reduction, the number of osteoblasts in the OOF group remained high when compared to SHAM ($p \leq 0.05$) group. After 60 days, we found less osteoblasts in the SHAM group, suggesting an advanced bone repair process. The osteopenic animals showed an early accelerated response, which became equivalent between both groups 30 days after injury. However, after that period, they showed a delayed osteoid mineralization, suggesting delayed late bone repair process.

Keywords: Osteoporosis, Ovariectomy, Osteopenia .

Citation: Sartori AR, Moreira J, Santos AMM, Cintra DEC, Sartori LR, Baraúna MA, Canto RST. Bone repair process in normal and osteopenic female rats. *tibiae: a comparative study.* *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2008; 16(1):37-40. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

mantidas ao longo da vida por um equilíbrio entre os aspectos mecânicos e fisiológicos⁽⁴⁾. No esqueleto adulto normal, o novo osso depositado pelos osteoblastos corresponde exatamente à reabsorção óssea osteoclástica⁽⁵⁾. Como resultado do hipoestrogenismo que é característico do período pós-menopausa, a atividade osteoblástica bem como a velocidade de depósito do osteóide é reduzida. Consequentemente, a reabsorção óssea aumenta em relação ao depósito, reduzindo a massa óssea, particularmente em ossos trabeculares^(4, 6-9). Fraturas resultantes de osteoporose são consideradas importante problema sócio-econômico devido

Trabalho realizado no Departamento de Fisioterapia do Centro Universitário do Triângulo – UNITRI – Uberlândia – MG.

Endereço para correspondências: Rua Alaor Ferreira da Fonseca, 470 Jd. América – Alfenas – MG-Brasil- CEP:37130000 – E-mail: gelsart@yahoo.com

1. Mestre em Fisioterapia Traumatológica-Ortopédica (Centro Universitário do Triângulo - Unitri) – Universidade de Alfenas – Unifenas e Centro Universitário do Triângulo – Unitri.
2. Bióloga – Universidade Federal de Alfenas – Unifal.
3. Biólogo – Universidade de Alfenas – Unifenas.
4. Mestre em Ciência da Nutrição (Universidade Federal de Viçosa - UFV) - Universidade de Alfenas – Unifenas e Universidade Federal de Alfenas – Unifal.
5. Farmacêutico – Universidade de Alfenas – Unifenas.
6. Doutor em Reabilitação (Universidade Técnica de Lisboa) – Centro Universitário do Triângulo – Unitri.
7. Doutor em Cirurgia Traumatológica e Ortopédica (Universidade Estadual de São Paulo – USP) – Centro Universitário do Triângulo – Unitri.

Trabalho recebido em 04/08/06 aprovado em 03/10/06

a alta frequência de mortalidade e morbidade, reduzida qualidade e expectativa de vida e altos custos médicos⁽¹⁰⁻¹²⁾. Alguns autores concordam com o fato de que a consolidação de fraturas em idosos é um processo mais lento que em adultos jovens⁽¹³⁾. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o reparo ósseo em idosos não tem diferença em relação à adultos jovens no que se refere à velocidade de consolidação e sim quanto à qualidade do osso neoformado^(1,2). O objetivo deste estudo foi comparar o reparo ósseo pós-lesão em tíbias de ratas osteopênicas e normais através da contagem de osteoblastos e da análise dos aspectos histológicos da consolidação óssea nas duas situações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: 49 ratas albinas fêmeas, linhagem Wistar, com peso corporal médio de 160 ± 20 g e 100 dias de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade de Alfenas - Unifenas. Os animais foram mantidos durante todo o experimento, em ambiente higienizado e receberam água e ração comercial *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos denominados: Ooforectomizado (O) e Pseudo-ooforectomizado (Grupo controle) – Sham (S). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para Experimentação Animal do UNITRI – Centro Universitário do Triângulo

1ª Cirurgia – Procedimento cirúrgico de ooforectomia e cirurgia simulada de ooforectomia: Vinte e cinco animais foram submetidos à cirurgia de ooforectomia. Inicialmente foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina e cloridrato de tiazina, na proporção de 3:1 respectivamente, com dose de 0,002mL/g de peso corporal. Em seguida a região do baixo ventre foi tricotomizada com lâmina e a antisepsia foi feita com álcool iodado. A incisão cirúrgica foi feita com lâmina de bisturi e uma pequena sutura com fio reabsorvível Categutte-Cromado (3-0), foi realizada na base uterina seguida pela ooforectomia bilateral e histerectomia. Ao final, as suturas internas foram feitas com fio reabsorvível e as externas com fio de nylon não reabsorvível. Os animais do grupo controle (Pseudo-ooforectomizados – SHAM – S) passaram pelas mesmas etapas cirúrgicas, com exceção da remoção do útero e ovários^(14,15).

2ª Cirurgia - Procedimento cirúrgico para produção de defeito ósseo cortical: Trinta dias após a cirurgia de ooforectomia (1ª cirurgia) os animais foram submetidos à cirurgia para produção de defeito ósseo cortical. Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados como descrito anteriormente. Durante o procedimento os animais foram mantidos na posição supina, com o membro esquerdo em rotação externa de quadril e tríplice flexão (quadril/jelho/tornozelo). Com um paquímetro posicionado a partir da interlinha articular do joelho até o maléolo medial, foi verificado foi calculado o terço proximal da tíbia, para a realização da lesão. Uma incisão correspondente na pele foi feita e fásia miotendínea da região foi afastada e foi feita a lesão óssea por escareação, utilizando-se uma broca odontológica Carbide esférica em motor de baixa rotação. Em um único movimento a mesma foi introduzida a 90°, em relação ao eixo longitudinal, no centro do osso cortical da face medial da tíbia (região diafisária), de modo a penetrar o osso cortical e lesar o trabeculado do canal medular, promovendo uma escareação com o diâmetro de 1,5 mm. Durante este procedimento, irrigação constante com soro fisiológico estéril foi mantida. Em seguida a pele foi suturada com fio não-absorvível e feita assepsia local com solução de PVPI (Polivinil Pírolidona Iodo), não havendo nenhum tipo de imobilização do segmento posteriormente^(16,17).

Sacrifício: Os animais foram sacrificados na 2ª, 4ª, 6ª e 8ª semanas respectivamente após a lesão óssea⁽¹⁸⁾, subgrupos I, II, III e IV respectivamente. Os animais foram inicialmente pesados e anestesiados com doses elevadas de anestésicos citados anteriormente, cloridrato de ketamina e cloridrato de tiazina, na proporção de 3:1, dose de 0,005mL/g de peso corporal.

Análise radiográfica:

Após o sacrifício as patas direitas foram desarticuladas no quadril e foram realizados exames radiográficos com as patas em posição de tríplice flexão. Foram utilizadas películas Kodak® 3 x 4 previamente identificadas. Os exames radiológicos foram utilizados para excluir as amostras que tiveram lesões ósseas completas

Análise histológica:

As tíbias direitas foram dissecadas e fixadas em solução de formal a 10% por cinco dias e depois lavadas em água corrente por 24 horas. Foram então incluídas em solução descalcificadora de MORSE (citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50%) por três dias e novamente lavados em água corrente por 24 horas. Posteriormente as peças foram desidratadas com soluções crescentes de álcool 70%, diafinizadas em álcool xilol, depois xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes longitudinais seriados de 5µm de espessura, a cada corte desprezavam de 5 a 7 até a obtenção do próximo, totalizando 3 cortes por peça. As lâminas foram coradas por Hematoxilina / Eosina (HE)⁽¹⁹⁾ e analisadas por microscopia de luz. Foram feitas fotos das extremidades direita e esquerda de cada corte, totalizando 6 fotos para cada amostra, utilizando um aumento de 40x. A análise morfométrica baseada na contagem de osteoblastos⁽²⁰⁾ foi feita usando uma tela milimetrada do software *Adobe Photo-Paint* – versão 6.0. A análise histológica foi realizada pelo mesmo avaliador de forma aleatória e cega.

Análise Estatística: O teste de Wilcoxon foi usado para a variável peso corporal, os testes de Mann-Whitney e Krsukal-Wallis foram utilizados para a variável contagem de osteoblastos. Nos casos significantes foi utilizado o teste de Duncan para discriminar as diferenças. Para todas as análises foi utilizado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Peso dos animais

Os pesos dos animais não apresentaram diferenças significantes ($p > 0,05$) quando submetidos à primeira cirurgia (OOF e SHAM) – Peso 1. Em ambos os grupos houve aumento progressivo de peso entre a 1ª e a 2ª cirurgia ($p \leq 0,05$), porém os animais OOF tiveram maior ganho de peso ($p \leq 0,05$), quando comparados aos do grupo controle (SHAM) à época da segunda cirurgia – Peso 2 (Figura 1).

Contagem de osteoblastos e Aspectos histológicos

Os subgrupos OOF-I e OOF-III apresentam uma quantidade significativamente maior ($p \leq 0,05$) quando comparados aos subgrupos SHAM (Figura 2). A contagem de osteoblastos só pode ser feita nos grupos I, II e III. No grupo IV não foi possível, pois as extremidades da lesão óssea já não se apresentavam mais delimitadas, sugerindo haver uma consolidação óssea completa (Figura 3 e 4).

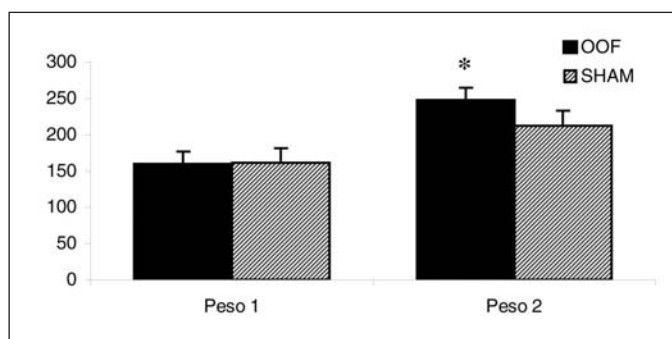


Figura 1- As barras representam as médias e desvio-padrão do peso corporal dos animais. * Diferente do Grupo SHAM, $p \leq 0,05$.

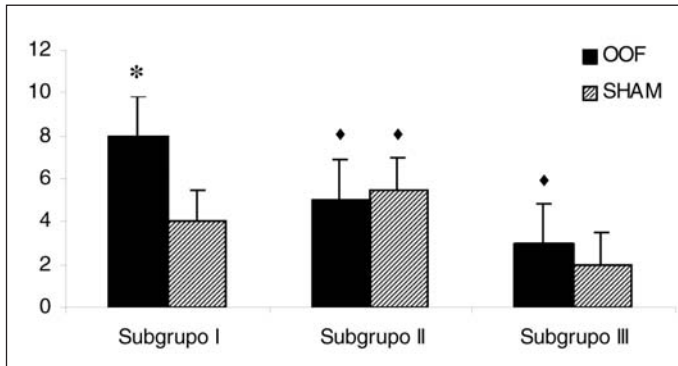


Figura 2 - As barras representam as medianas e desvio-padrão do número de osteoblastos nos subgrupos experimentais.

* $p \leq 0,05$ diferente de todos os subgrupos SHAM.

♦ $p \leq 0,05$ diferente do subgrupo III SHAM.

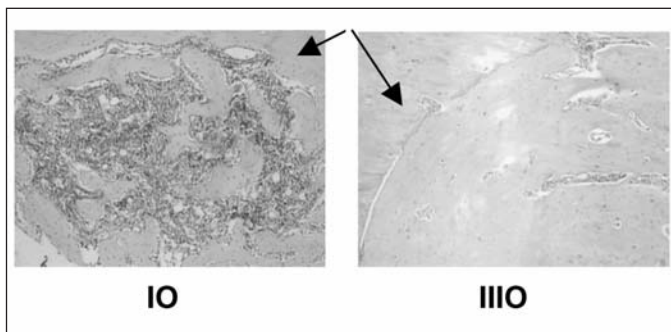


Figura 3 - Fotos histológicas dos subgrupos ooforectomizados (OOF) I à esquerda e III à direita. As setas apontam para as extremidades das lesões ósseas.

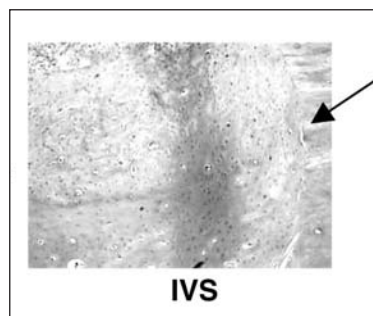
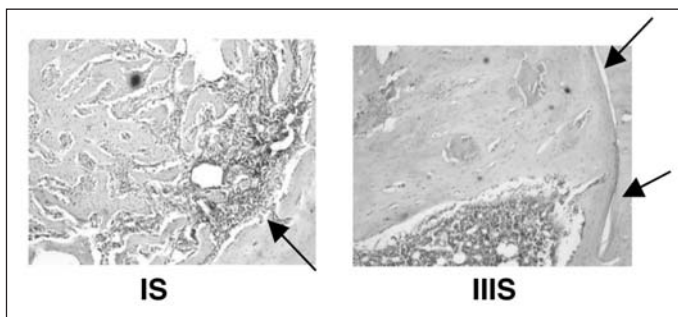


Figura 4 - Fotos histológicas dos subgrupos não-ooforectomizados (SHAM) I à esquerda, III no centro e IVS à direita. As setas apontam para as extremidades das lesões ósseas. Note que no grupo IVS tal extremidade já é praticamente indistinguível.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, todos os animais tinham a mesma idade (100 dias) e não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os pesos iniciais, demonstrando, ser uma amostra homogênea. Todos os animais aumentaram de peso 30 dias após a cirurgia de ooforectomia (OOF) e cirurgia simulada (SHAM), sendo que os animais do grupo

OOF tiveram um ganho de peso significativamente maior ($p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo SHAM. O estrogênio aumenta o consumo energético enquanto em caso de hipostrogenismo, o consumo é menor com consequentemente aumento de peso corporal^(14,21,22). A privação dos hormônios ovarianos está relacionada com o ganho de peso e diminuição da densidade mineral óssea^(2,15,23). Carvalho e Cliquet⁽¹⁴⁾ afirmaram que trinta dias após a cirurgia, os animais ooforectomizados apresentaram menor quantidade de cálcio e fósforo em comparação aos animais não-ooforectomizados indicando, portanto, ser um protocolo eficaz para a indução de osteopenia e por isso o escolhido para este estudo. O grau de dano aos tecidos moles interfere no modelo experimental de lesão óssea, mas a tibia do rato oferece a vantagem de ter somente uma pequena parte coberta por músculos. O modelo de lesão óssea esférica produz lesões idênticas em relação a posição e tamanho⁽²⁴⁾. Para analisarmos a formação de osteóide e sua mineralização, foram feitas contagens de osteoblastos. O grupo osteopênico apresentou maior atividade osteoblástica nos primeiros 15 dias pós-lesão óssea ($p < 0,05$). Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura⁽¹⁴⁾ que relataram maior quantidade de osteoblastos nos animais ooforectomizados, talvez como uma tentativa de reverter o aumento acelerado da perda de massa óssea, após supressão de estrogênio. Houve uma redução na quantidade de osteoblastos 30 dias pós-lesão óssea com valores equivalentes entre os dois grupos OOF-II e SHAM-II, sugerindo uma equivalência no processo de reparo ósseo nesse período, apesar da resposta inicial exacerbada do grupo OOF. No período subsequente, 45 dias pós-lesão, apesar da constante diminuição no número de osteoblastos, o grupo OOF-III permaneceu discretamente elevado quando comparado ao grupo controle SHAM-III ($p < 0,05$). Mas este fato talvez possa ser explicado pelo número reduzido de amostras colhidos no grupo SHAM devido à dificuldade de visualização das extremidades das lesões, sugerindo que os animais do grupo SHAM já estavam em estado avançado no processo de reparo ósseo quando comparados com os animais do grupo OOF nesse período. Neste estudo, o número elevado de osteoblastos nos primeiros 15 dias pós-lesão no grupo OOF, pode também ser sugestivo de atraso inicial da consolidação. Muitos estudos têm demonstrado que os animais osteopênicos apresentam atraso no período inicial de reparo das lesões ósseas^(1,2,18). Os valores equivalentes de osteoblastos nos dois grupos (OOF e SHAM) 30 dias pós-lesão óssea sugere que a tentativa de reverter o processo de perda óssea, através do acréscimo de osteoblastos na fase inicial, pode ter funcionado, demonstrando não haver diferenças no reparo ósseo entre os grupos nessa fase. Porém, 45 dias pós-lesão, que já pode ser considerado como a fase de remodelação, a permanência de valores elevados de osteoblastos no grupo OOF em comparação ao grupo SHAM pode ser sugestivo de atraso de mineralização da matriz osteóide e conseqüentemente atraso na reparação óssea pelo prolongamento da fase de calcificação endocondral, portanto, aumentando o período de remodelação^(1,2,15,18). Lesões ósseas podem consolidar-se mesmo sob condições de baixa densidade mineral e baixos níveis de estrogênio. Porém, a deficiência desse hormônio atrasa o processo de acréscimo de minerais à matriz osteóide. Assim, o tecido ósseo neoformado nos animais osteopênicos pós-lesão óssea, apresenta alterações osteoporóticas, como por exemplo, baixos valores para as propriedades mecânicas, menor quantidade de osso mineral e diminuição da densidade mineral, sugerindo uma qualidade óssea inferior^(1,2,15,18,25). Ooforectomia não só diminui a densidade mineral como atenua o ganho de massa óssea pós-fratura⁽¹⁵⁾. Osteoporose afeta o período inicial do reparo e a mineralização do calo tardiamente. As propriedades mecânicas inferiores do calo ósseo dos animais osteoporóticos podem refletir a diminuição da qualidade óssea⁽²⁶⁾. O entendimento sobre a reparação óssea em indivíduos osteoporóticos é essencial para o estabelecimento de medidas terapêuticas mais objetivas resultando

na diminuição do período de tratamento, bem como, em melhores condições de reabilitação. Os resultados deste trabalho sugerem que o reparo pós lesão em ossos osteoporóticos segue a mesma seqüência de eventos que em ossos normais, porém apresentando uma ligeira aceleração inicial, nos primeiros 15 dias, sendo que no período subsequente de 30 dias não houve diferença entre o reparo nos dois tipos de ossos, de acordo com as variáveis analisadas. Porém, após este período os ossos osteoporóticos apresentaram

um retardo no período de reparo por permanecerem um período maior de tempo na fase de mineralização do osteóide.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem às Professoras Helena Chini e Ana Maria Duarte da Faculdade de Medicina da Universidade de Alfenas e aos Professores Hercílio Martelli Júnior e Luiz Antonio Sartori da Faculdade de Odontologia de Alfenas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999; 68:197-202.
- 2- Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone.* 2001; 28:80-6.
- 3- Gali JC. Osteoporose. *Acta Ortop Bras* 2001; 9: 53-62.
- 4- Pereira SRM, Mendonça LMC. Osteoporose e osteomalácia. In: Gorzoni ML, Rocha SM. *Tratado de geriatria e gerontologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.???
- 5- Sambrook P, Schrieber L, Taylor T, Ellis A. O sistema musculoesquelético. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
- 6- Lewin S, Gouveia CHA, Marone MMS. Vertebral and femoral bone mineral density of 724 caucasian Brazilian women: influence of age and body weight. *Rev Assoc Med Bras.* 1997; 43:127-36.
- 7- Botell M. Osteoporosis em la menopausia, prevención y estrategias terapéuticas actuales. *Rev Cub Obst Ginecol.* 2001; 27:199-204.
- 8- Bonduki CE, Haidar MA, Lima GR. Effect of estrogen-progestin hormonal replacement therapy on plasma antithrombin III of postmenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:330-3.
- 9- Guarniero R. Osteoporose In: Hebert S. *Ortopedia e traumatologia - Principios e prática.* Porto Alegre: Artmed; 2003, 763-5.
- 10- Anjos L. Fraturas do fêmur proximal em idosos. *Rev Bras Med.* 1999; 56:1013-24.
- 11- Ramalho AC, Lazaretti-Castro M, Hauache O, Vieira JG, Takata E, Cafalli F, et al. Osteoporotic fractures of proximal femur: clinical and epidemiological features in a population of the city of Sao Paulo. *Sao Paulo Med J.* 2001; 119:48-53.
- 12- Fernandes IC, Freire CRS, Peres MP. Osteoporose – Epidemiologia. *JBM.* 2002; 82:32-37.
- 13- Buckwalter JA, Cruess RL. A cura dos tecidos musculoesqueléticos. In: *Fraturas em adultos.* 3a. ed. São Paulo: Manole; 1993.
- 14- Carvalho DCL, Cliquet Junior A. Ação do ultra-som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. *Acta Ortop Bras.* 2003; 11:17-24.
- 15- Meyer RA Jr, Tshakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res.* 2001; 19:428-35.
- 16- Giordano V, Giordano M, Knackfuss IG, Apfel MI, Gomes RD. Effect of tenoxicam on fracture healing in rat tibiae. *Injury.* 2003; 34:85-94
- 17- Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Hoffling MA. Laser effects on osteogenesis. *Appl Surf Sci.* 2000; 154-155, 548-54.
- 18- Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res.*, 1997; (342): 218-27.
- 19- Marino JAM, Taciro C, Zuanon JAS, Benatti Neto C, Parizotto NA. Efeito do Laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tibia de rato. *Rev Bras Fisioter.* 2003; 7:167-73.
- 20- Morisco AS, Carneiro J, Abrahamsohn PA. *Histologia para fisioterapia e outras áreas de reabilitação.* Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2004.
- 21- Guyard B, Fricker J, Brigant L, Betoulle D, Apfelbaum M. Effects of ovarian steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. *Metabolism.* 1991; 40:529-33.
- 22- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995; 17:(4 Suppl):125S-133S.
- 23- Vasconcellos LS, Leite JM, Sabino KR, Petriann L. Influência da ooforectomia na variação podênria em ratas jovens e adultas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48:299-304.
- 24- Bak B, Jensen S. Standardization of tibial fractures in the rat. *Bone.* 1992; 13:289-95.
- 25- Han SM, Szarzanowicz TE, Ziv I. Effect of ovariectomy and calcium deficiency on the ultrasound velocity, mineral density and strength in the rat femur. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 1998; 13:480-4.
- 26- Lill CA, Hessel J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res.* 2003; 21:836-42.