

Uso isolado e combinado de bisfosfonatos, estatina e flavonóide em ratas osteoporóticas*

Gláucia Guimarães Amaral¹, Ricardo Junqueira Del Carlo², Tânia Toledo de Oliveira³, Mário Jefferson Quirino Louzada⁴, Rilene Ferreira Diniz Valadares², Mariella Dias Ribeiro⁵ e Aloísio da Silva Pinto^{2*}

ABSTRACT. Amaral G.G., Del Carlo R.J., Oliveira T.T., Louzada M.J.Q., Valadares R.F.D., Ribeiro M.D. & Pinto A.S. [Isolated and combined use of bisphosphonates, statins and flavonoids in osteoporotic female rat.] Uso isolado e combinado de bisfosfonatos, estatina e flavonóide em ratas osteoporóticas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(1):105-110, 2014. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, S/N, Viçosa, MG 36571-000, Brasil. E-mail: aloisio@ufv.br

This study aimed to treat osteoporosis induced by ovariectomy through the single and combined use, by employing, in this case, half of the defined doses of the isolated compounds etidronate, risedronate (bisphosphonates), pravastatin (statin) and ipriflavone (flavonoid). The experiment consisted of 66 rats were divided into 11 groups of 6 animals, taking control and osteoporosis, the most isolated groups etidronate, risedronate, pravastatin and ipriflavone and associated etidronate + pravastatin, etidronate + ipriflavone, risedronate + pravastatin, risedronate + ipriflavone and pravastatin + ipriflavone. After 12 weeks of ovariectomy, began administering the drug orally for 30 days. After 35 days, the animals were sacrificed and blood was collected for biochemical analysis and the tibias for analysis bone mineral density. The value of the biochemical markers calcium, phosphorus, albumin, total protein and bone alkaline phosphatase presented no statistically significant differences. These results provide no information for the diagnosis and monitoring of osteoporosis. Bone densitometry presented significant results for induction and for different treatments, in relation to the osteoporotic group. The results reveal that associations have the same pharmacological activity as isolated substances, and no antagonistic effect was observed. Thus, associations can be a therapeutic alternative, since possible side effects can be reduced by the administration of half the individual dose prescribed.

KEY WORDS. Osteoporosis, Ovariectomy, bisphosphonates, statins and flavonoids.

RESUMO. Este trabalho teve como finalidade tratar a osteoporose induzida por ovariectomia através do uso isolado e combinado, utilizando, neste

caso, metade das doses estabelecidas dos compostos isolados etidronato, risedronato (bisfosfonatos), pravastatina (estatina) e ipriflavona (flavonóide). O

* Recebido em 28 de junho de 2012.

Aceito para publicação em 19 de dezembro de 2013.

¹ Médica-veterinária. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36571-000, Brasil. E-mail: gau.amaral@gmail.com

² Médico-veterinário. Departamento de Veterinária, UFV, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36571-000. E-mails: ricarlo@ufv.br, rilene@ufv.br, *Autor para correspondência, E-mail: aloisio@ufv.br

³ Química. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36571-000. E-mail: ttoliveira@ufv.br

⁴ Engenheiro Elétrico. Curso de Medicina Veterinária (Biofísica), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp-Araçatuba, Rua Clóvis Pestana, 793, D. Amélia, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil. E-mail: louzada@fmva.unesp.br

⁵ Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, UFV, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36571-000. E-mail: mariella.d@hotmail.com

experimento foi constituído de 66 ratas que foram divididas em 11 grupos com 6 animais, tendo o controle e o osteoporótico, mais os grupos isolados etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona e os associados etidronato + pravastatina, etidronato + ipriflavona, risedronato + pravastatina, risedronato + ipriflavona e pravastatina + ipriflavona. Após 12 semanas da ovariectomia, iniciou-se administração dos medicamentos, por via oral, durante 30 dias. Aos 35 dias, os animais foram sacrificados e coletou-se o sangue para análise dos marcadores bioquímicos e as tíbias para análise da densidade mineral óssea. Os valores dos marcadores bioquímicos cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados não fornecem subsídio para o diagnóstico e acompanhamento da osteoporose. A densitometria óssea mostrou resultados significativos tanto para a indução quanto para os diversos tratamentos em relação ao grupo osteoporótico. Os resultados mostram que as associações mantêm a mesma atividade farmacológica que as substâncias isoladas, não sendo percebido efeito antagônico. Deste modo, as associações podem ser uma alternativa terapêutica, visto a possibilidade de diminuição de possíveis efeitos colaterais, uma vez que foram usadas metade das doses individuais prescritas.

PALAVRAS-CHAVE. Osteoporose, ovariectomia, bisfosfonatos, estatina e flavonóide.

INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença progressiva que envolve deterioração estrutural do tecido ósseo, levando a fragilidade e aumento da suscetibilidade a fraturas, devido redução da massa óssea e ao aumento do *turnover* ósseo (NOF 2002).

O objetivo do tratamento da osteoporose é evitar a ocorrência de futuras fraturas que acarreta na diminuição da qualidade de vida. Atualmente, utiliza-se nas terapias farmacológicas agentes antiabsortivos que inibem a reabsorção do osso ou agentes formadores de osso que restauram a massa óssea.

Os bisfosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato, estes fármacos atuam ligando-se a cristais hidroxapatitas, exercendo assim inibição da absorção osteoclástica e inibição da desmineralização óssea, propriedades essas que o caracterizam como agente antiabsortivo (Vitte et al. 1996). As estatinas podem causar ganhos substanciais de tecido ósseo devido a seus efeitos promotores sobre o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética ós-

sea-2), o qual conduz a diferenciação osteoblástica e a formação óssea. Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural. São compostos polifenólicos que possuem efeitos favoráveis à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos e inibição da absorção óssea (Notoya et al. 1993, Albanese et al. 1994).

Recomendam-se modelos animais específicos para avaliação de novos agentes com potencial para terapêutica da osteoporose clínica (Thompson et al. 1995), sendo a rata ovariectomizada o mais utilizado para estudar as consequências de perda óssea na estrutura e resistência óssea ou para validar estratégias terapêuticas (Bagi et al. 1996).

A terapia de combinação possui considerável aceitação como um meio de aumentar os benefícios do tratamento em pacientes com doenças crônicas. Em osteoporose, poucos dados estão disponíveis para regimes de combinações e avaliações seguras têm sido confiadas em densidade mineral óssea (DMO) usada como um marcador (Cosman et al. 2001). A mensuração da DMO é feita utilizando a absorção de raios-X de dupla energia (DXA[®]). A DXA é reconhecida como o método mais valioso não-invasivo para medição mineral óssea (Fogelman & Ryan 1992) e sua ampla utilização é devido a características tais como a velocidade, precisão e baixa exposição à radiação.

Assim, por haver necessidade em buscar alternativas mais eficazes e menos dispendiosas no controle e principalmente no tratamento da osteoporose estabelecida, o presente experimento foi idealizado na tentativa de tratar a osteoporose induzida por ovariectomia através do uso isolado e combinado, utilizando, neste caso, metade das doses dos compostos isolados etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona, que são agentes que demonstraram efeitos positivos sobre o metabolismo ósseo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 66 ratas da raça Wistar, adultas, pesando em média 250g, procedentes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e alimentadas com ração padronizada comercial para alimentação de ratos de laboratório e água *ad libitum* durante todo experimento.

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais estão em concordância com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, tendo sido o projeto aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

A osteoporose foi induzida por ovariectomia. A in-

tervenção cirúrgica, em 60 animais, foi feita quando os animais completaram 5 meses de idade, por incisão retroumbilical, dando acesso a cavidade abdominal, sob anestesia geral, utilizando da associação de quetamina e xilazina nas doses de 50 e 5 mg/kg, respectivamente.

Após 12 semanas, deu-se início ao tratamento farmacológico. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 11 grupos experimentais, sendo os grupos constituídos de 6 animais. O grupo 1 (G1), controle, foi constituído de animais normais. O grupo 2 (G2) foi somente submetido à cirurgia. Os demais grupos, além do processo cirúrgico, foram tratados com os medicamentos; o grupo 3 (G3) recebeu etidronato (6 mg/kg) (dose de 400mg preconizada para humanos), o grupo 4 (G4) risedronato (0,07 mg/kg) (dose de 5mg preconizada para humanos), o grupo 5 (G5) pravastatina (0,6 mg/kg) (dose de 40mg preconizada para humanos), o grupo 6 (G6) ipriflavona (100 mg/kg), dose esta utilizada em ratas intactas ou ovariectomizadas (Thorndike & Turner 1998, Arjmandi et al. 2000), o grupo 7 (G7) etidronato e pravastatina (3 mg/kg e 0,3 mg/kg), o grupo 8 (G8) etidronato e ipriflavona (3 mg/kg e 50 mg/kg), o grupo 9 (G9) risedronato e pravastatina (0,035 mg/kg e 0,3 mg/kg), o grupo 10 (G10) risedronato e ipriflavona (0,035 mg/kg e 50 mg/kg) e o grupo 11 (G11) pravastatina e ipriflavona (0,3 mg/kg e 50 mg/kg). Todas as substâncias foram administradas por via oral, diariamente, durante 30 dias.

Imediatamente antes dos animais serem eutanasiados com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 50mg/kg), aos 35 dias, foram coletados, através de punção da veia cava caudal, 5ml de amostra de sangue para a dosagem dos níveis séricos de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea (FAO). A seguir, através de dissecação do tecido muscular, as tíbias direitas foram coletadas e congeladas para estudo densitométrico.

As dosagens sorológicas de cálcio, fósforo, albumina e proteínas totais foram realizadas utilizando o Aparelho Multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), bem como “kits” específicos da marca Biolab, sendo os resultados expresso em mg/dL.

Para as dosagens sorológicas de fosfatase alcalina ós-

sea foi utilizado o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter, assim como “kits” Ostase, específico para dosagem da FAO, também da mesma indústria.

Para análise densitométrica, as tíbias direitas foram coletadas, identificadas e envolvidas em gaze umedecida com solução fisiológica e conservadas em freezer a 20°C negativos, até serem analisadas.

A densidade mineral óssea (DMO) foi mensurada nas tíbias dos animais, utilizando densitômetro ósseo de Raio-X com Smart Scan modelo DPX-ALPHA, com software especial para pequenos animais.

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com 11 tratamentos em 6 repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste F ($p < 0,05$). Os grupos controles (G1 e G2) foram comparados entre si por meio do teste F. Os grupos tratados (G3 a G11) foram comparados entre si, através do teste de comparação múltipla Tukey, à 5% de probabilidade. As comparações também foram realizadas entre os grupos tratados e os controles G1 e G2, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Os resultados dos marcadores bioquímicos séricos cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea de ratas submetidas aos tratamentos com etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona isolados e combinados são apresentados na Tabela 1.

Na Tabela 1, verificamos que não há diferença significativa para os valores de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea séricos entre os grupos tratados, bem como entre o grupos controle (G1) e osteoporótico (G2). Desta forma, estes parâmetros bioquímicos não possibilita direcionar no sentido do diagnóstico da osteoporose.

Tabela 1. Valores médios de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, e fosfatase alcalina óssea séricos de ratas submetidas a diferentes tratamentos.

Grupos	Cálcio mg/dl	Fósforo mg/dl	Albumina g/dl	Proteínas Totais g/dl	Fosfatase Alcalina Óssea pg/dl
G1 Controle	12,72±0,26 A	7,70±0,46A	4,52±0,17 ^a	82,54±4,36A	0,067±0,030 A
G2 Osteoporótico	12,64±0,29 A	7,74±0,30A	4,35±0,26 ^a	80,21±2,87A	0,060±0,032 A
G3 Etidronato	12,36±0,48 a	7,53±0,40 a	4,24±0,19 a	76,27±2,45 a	0,063±0,025 a
G4 Risedronato	12,73±0,64 a	7,55±0,65 a	4,32±0,26 a	81,69±3,46 a	0,064±0,031 a
G5 Pravastatina	12,82±0,50 a	7,80±0,33 a	4,26±0,15 a	81,24±3,44 a	0,061±0,026 a
G6 Ipriflavona	12,75±0,57 a	7,90±0,29 a	4,27±0,08 a	75,92±4,41 a	0,060±0,034 a
G7 Etidronato+Pravastatina	12,45±0,55 a	7,62±0,54 a	4,61±0,18 a	84,35±1,99 a	0,064±0,031 a
G8 Etidronato+Ipriflavona	12,54±0,48 a	7,68±0,61 a	4,41±0,13 a	82,75±3,21 a	0,060±0,036 a
G9 Risedronato+Pravastatina	12,47±0,61 a	7,57±0,57 a	4,69±0,09 a	84,68±4,10 a	0,061±0,024 a
G10 Risedronato+Ipriflavona	12,56±0,53 a	7,66±0,42 a	4,57±0,10 a	82,31±3,30 a	0,062±0,028 a
G11 Pravastatina+Ipriflavona	12,53±0,56 a	7,67±0,35 a	4,53±0,21 a	83,57±3,54 a	0,063±0,027 a

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

Médias seguidas de pelo menos um letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 2. Valores médios de densidade mineral óssea das tíbias e variações percentuais em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos.

Grupos	DMO	Variação % em relação a G1	Variação % em relação a G2
G1 Controle	0,181±0,0341 A	-	-
G2 Osteoporótico	0,146±0,0151 B	-	-
G3 Etidronato	0,175±0,0093 a	- 3,31	+19,86**
G4 Risedronato	0,192±0,0075 a	+ 6,07	+31,50**
G5 Pravastatina	0,179±0,0166 a	- 1,10	+22,6**
G6 Ipriflavona	0,184±0,0162 a	+ 1,66	+26,0**
G7 Etidronato+Pravastatina	0,182±0,0063 a	+ 0,55	+24,6**
G8 Etidronato+Ipriflavona	0,182±0,0099 a	+ 0,55	+24,6**
G9 Risedronato+Pravastatina	0,184±0,0113 a	+ 1,66	+26,0**
G10 Risedronato+Ipriflavona	0,180±0,0024 a	- 0,55	+24,6**
G11 Pravastatina+Ipriflavona	0,170±0,0167 a	- 6,07	+16,43**

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

*Estatisticamente diferente do controle (G1) pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

**Estatisticamente diferente do grupo G2 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Na Tabela 2, são apresentados os resultados da densidade mineral óssea das tíbias de ratas ovariectomizadas submetidas aos tratamentos com etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona isolados e combinados.

Na Tabela 2, a indução osteoporótica por meio da ovariectomia pôde ser constatada, o que valida este método para ser usado no estudo desta patologia. Quando comparado ao grupo osteoporótico G2, todos os tratamentos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o que demonstra a capacidade destes tratamentos de restaurar o tecido ósseo.

DISCUSSÃO

Segundo estudo realizado por Dempster et al. (1995), as ratas apresentam um aumento no *turnover* ósseo após a ovariectomia, que é evidenciado pelo aumento de osteoclastos na superfície óssea. Segundo Thompson et al. (1995), em ratas castradas, a tíbia proximal e a vértebra lombar, por exemplo, respondem similarmente à deficiência de estrógeno como mensurado pela perda de osso trabecular e resposta positiva ao tratamento com estrógeno, o que pode ser evidenciado neste estudo em tíbias de ratas pela densitometria óssea.

A densitometria óssea vem sendo utilizada para avaliar a densidade óssea e é referida como recurso útil no diagnóstico e orientação terapêutica com vistas ao tratamento de doenças osteometabólicas, estudos de reparações ósseas de fraturas e procedimentos cirúrgicos (Louzada 2001). A DMO explica

de 60 a 80% da variabilidade na resistência mecânica do osso e, uma diminuição na DMO, tem uma próxima correlação com a ocorrência das fraturas na osteoporose (Bell et al. 1967, Mosekilde et al. 1987, Cortet et al. 1995). Os agentes farmacológicos responsáveis por suprimir o *turnover* ósseo, aumentando a densidade mineral óssea, estão sendo desenvolvidos e avaliados por esse método (Jerome & Peterson 2001).

O uso associativo de medicamentos tem sido visto como uma forma de otimizar o tratamento de doenças crônicas. Em relação à osteoporose, as associações ainda são reduzidas e avaliações seguras tem sido confiadas à densidade mineral óssea (DMO), usada como um marcador (Harris et al. 2001).

Em relação aos marcadores bioquímicos, resultados significativos não foram encontrados entre os grupos controle, osteoporótico e tratados. O que pode ser explicado no caso de cálcio e fósforo pela homeostase presente no organismo. Qualquer alteração sanguínea de cálcio superior a 2,4 mmol/L é rapidamente corrigido principalmente pelo hormônio da paratireóide. Resultados concordantes com estes também foram encontrados por, Cecchetti et al. (1995), Motta (2003) e Santos (2004), em estudos sobre a osteoporose.

Proteínas totais são envolvidas em múltiplas funções, tais como a manutenção da pressão osmótica e da viscosidade do sangue, o transporte de nutrientes, metabólitos, hormônios e produtos de excreção, regulação do pH sanguíneo e a participa-

ção na coagulação sanguínea (González & Scheffer 2002). No estudo de Sequetto (2008), observou que as alterações entre os grupos tratados e o osteoporótico foram estatisticamente significativas, o que não foi mostrado neste estudo.

Com relação às albuminas, Sequetto (2008) também encontrou diferença significativa dela entre os tratamentos e o grupo osteoporótico. Tendo em vista que ela é a principal proteína responsável pelo transporte de medicamentos e nutrientes, um aumento na sua concentração acaba sendo refletido nos valores de proteínas totais, o que também foi constatado pela pesquisadora. No entanto, neste estudo as albuminas assim como as proteínas totais não se apresentaram significativas, sendo possivelmente reflexo da metodologia de indução.

Alterações estatisticamente significativas nos valores de fosfatase alcalina óssea (FAO) não foram observadas no presente estudo, corroborando resultados obtidos por Pinto (2005) e Sequetto (2008), no entanto os resultados encontrados por Kim, Lee & Rhee (2003) divergem dos resultados anteriores, visto que está enzima é um marcador utilizado para formação óssea (Bikle 1997, Vieira 1999).

Tendo em vista que há agentes formadores de osso, como as estatinas e agentes antiabsortivos, como os bisfosfonatos, existe uma forte razão teórica para a associação dos mesmos, no intuito de obter resultados mais satisfatórios. No entanto, os primeiros estudos não se mostraram tão promissores, segundo Black et al. (2003).

Outros estudos tem associado bisfosfonatos, moduladores seletivos do receptor estrogênico, hormônio da paratireóide, estrógeno, estrógeno e progesterona e calcitonina (Pinkerton & Dalkin 2007). As primeiras pesquisas associando estatinas, flavonóides e bisfosfonatos foram realizadas por Pinto (2004), onde obteve excelentes resultados com as associações, mostrando-as bem mais efetivas que o uso isolado dos medicamentos.

Neste estudo, também pôde se observar resultados positivos com as associações, apesar delas não terem se mostrado melhores do que os compostos isolados como foi constatado por Pinto (2004), o que não inviabiliza sua utilização, pois nos tratamentos associados etidronato + pravastatina, etidronato + ipriflavona, risedronato + pravastatina, risedronato + ipriflavona e pravastatina + ipriflavona foi utilizado a metade da dose dos isolados, tornando-os assim, uma forma menos danosa ao organismo, visto que os possíveis efeitos colaterais estariam sendo minimizados.

CONCLUSÃO

Neste estudo, os parâmetros bioquímicos não apresentaram diferenças significativas entre os diversos tratamentos, portanto não mostraram evidências que permita conduzir ao diagnóstico da osteoporose, bem como do seu tratamento.

A densitometria óssea se mostrou excelente método para estudo da atividade metabólica óssea, sendo um recurso útil no diagnóstico e orientação terapêutica.

REFERÊNCIAS

- Albanese C.B., Cudd A., Argentino L., Zamboni-Zallone A. & Macintyre I. Ipriflavone directly inhibits osteoclasts activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199:930-936, 1994.
- Arjmandi B.H., Birnbaum R.S., Juma S., Barenholtz E. & Kukreja S.C. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevents bone loss by different mechanisms. *Calcif Tissue Int.*, 66:61-65, 2000.
- Bagi C.M., Wilkie D., Georgelos K., Williams D. & Bertolini D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. *Bone*, 3(21):261-267, 1997.
- Bell G.H., Dunbar O., Beck J.S. & Gibb A. Variations in strength of vertebrae with age and their relation with osteoporosis. *Calcif Tissue Int.*, 1:75-86, 1967.
- Bikle D.D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. *Am. J. Med.*, 103:427-436, 1997.
- Black D.M., Greenspan S.L., Ensrud K.E., Palermo L. & McGowan J.A. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 349:1207-1215, 2003.
- Cecchetti M., Bellometti S., Cremonesi G., Solimeno L.P. & Torri G. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. *Biomed. & Pharmacoth.*, 49:465-468, 1995.
- Cortet B., Colin D., Dubois P., Delcambre B. & Marchandise X. Methods for quantitative analysis of trabecular bone structure. *Rev. Rhum. [Engl. Ed.]*, 62:781-794, 1995.
- Cosman F., Nieves J., Woelfert L., Formica C., Gordon S. & Shen V. Parathyroid hormone added to established hormone therapy: effects on vertebral fracture and maintenance of bone mass after parathyroid hormone withdrawal. *J. Bone Miner. Res.*, 16:925-931, 2001.
- Dempster D.W., Birchman R., Xu R., Lindsay R. & Shen V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone*, 1(16):157-161, 1995.
- Fogelman I. & Ryan P. Measurement of bone mass. *Bone*, 13:S23-S28, 1992.
- González F.H.D. & Scheffer J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análises clínica, metabólica e nutricional. Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais. 2002. 29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado.
- Harris S.T., Eriksen E.F., Davidson M., Ettinger M.P., Moffett A.H. & Baylink D.J. Effect of combined risedronate and hormone replacement therapies on bone mineral density in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86:1890-1897, 2001.
- Jerome C.P. & Peterson P.E. Nonhuman primate models in skeletal research. *Bone*, 29:1-6, 2001.
- Kim S., Lee M. & Rhee M. Studies on the effects of biomedical agents on serum concentration of Ca²⁺, P and ALP activity in osteoporosis-induced rats. *J. Vet. Sci.*, 4(2):151-154, 2003.
- Louzada M.Q.J. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbula de coelhos castrados. *Rev. Fac. Odontol.*, 13(1):33-38, 2001.
- Mosekilde L.I., Mosekilde L.E. & Danielsen C.C. Biochemical competence of vertebral trabecular bone in relation to ash density and age in normal individuals. *Bone*, 8:79-85, 1987.

- Motta V.T. *Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações*. 4ª ed. Editora Médica Missau, Porto Alegre, 2003. 419p.
- NOF America's Bone Health. The state of osteoporosis and low bone mass. 2002. Internet Creations.
- Notoya K., Yoshida K., Taketomi S., Yamazaki I. & Kumegawa M. Inhibitory effects of ipriflavone on osteoclast-mediated bone resorption and new osteoclast-mediated formation in long-term cultures of mouse unfractionated bone cells. *Calcif. Tissue Int.*, 53:206-209, 1993.
- Pinkerton J.V. & Dalkin A.C. Combination therapy for treatment of osteoporosis: A review. *A. J. Obst. Gynecol.*, 559-565, 2007.
- Pinto A.S. Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona, isoladamente e em associação, na osteoporose induzida com dexametasona. Dissertação de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 54p. (Capturado em: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/bioquimica agricola/2004/183037f.pdf>).
- Pinto A.S., Oliveira T.T., Nagem T.J., Del Carlo R.J., Fonseca C.C., Moraes G.H.K., Bragine D.F.J. & Cardoso C.A. Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona sobre a osteoporose induzida com dexametasona em ratas. *Rev. Ciên. Farmac. Básica e Aplicada*, 26(1):63-70, 2005.
- Santos P.S. Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 50p. (Capturado em: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/medicina veterinaria/2004/183003f.pdf>).
- Sequetto P.L. Efeitos de alendronato de sódio, sinvastatina, crisina e tintura de *Camellia sinensis* na osteoporose induzida por dexametasona em ratas. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, 2008. 202p. (Capturado em : http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/28/TDE-2009-07-02T060754Z-1753/Publico/texto%20completo.pdf).
- Thompson D.D., Simmons H.A., Pirie C.M. & Ke H.Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, 4(17), 1995.
- Thorndike E.A. & Turner A. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front. Biosci.* Tampa, 3:7-26, 1998.
- Vieira J.G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, (43):415-422, 1999.
- Vitte C., Fleish H. & Guenther H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology*, 137:2324-2333, 1996.