

## EL OLPADRONATO PREVIENE LA PERDIDA DE HUESO CORTICAL Y TRABECULAR INDUCIDA POR DOSIS SUPRAFISIOLÓGICAS DE TIROXINA EN RATAS OVARIECTOMIZADAS\*

SUSANA N. ZENI, CLAUDIA GOMEZ ACOTTO, SILVANA DI GREGORIO

Sección Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** En el presente estudio experimental en ratas se evaluaron los efectos de la ovariectomía (OVX) y la administración de tiroxina (T4) sobre la densidad mineral ósea (DMO) del hueso cortical y trabecular. Además se estudió la eficacia del olpadronato (Olpa) para prevenir la pérdida ósea axial y periférica inducida por el exceso de hormonas tiroideas. Ratas hembras Sprague-Dawley (220 ± 2 gr) se dividieron en los siguientes grupos: SHAM, OVX+Vh (Vh: vehículo); OVX+T4 (T4 250 µg/kg peso/día); OVX+Olpa (0.3 mg de Olpa/kg de peso/semana) y OVX+T4+Olpa (ambos: T4+Olpa). La DMO de las OVX+Vh fue significativamente menor que la de las SHAM en tibia total ( $p < 0.01$ ) pero no en el fémur ni en la columna lumbar. En el segmento medio de la tibia los resultados fueron similares en ambos grupos; un valor menor se observó en la parte distal (pns) y en la proximal ( $p < 0.003$ ) en el grupo OVX+Vh. La DMO de las OVX+T4 fue significativamente menor que la de las OVX+Vh en la tibia total ( $p < 0.02$ ), el fémur ( $p < 0.006$ ), la columna lumbar ( $p < 0.006$ ); además, la DMO de las OVX+T4 fue menor en todos los sectores analizados de la tibia, pero alcanzó un nivel estadísticamente significativo sólo en la parte media ( $p < 0.004$ ). La DMO de las OVX+Olpa fue mayor que la de las OVX+Vh en fémur ( $p < 0.002$ ), columna lumbar ( $p < 0.03$ ), tibia total ( $p < 0.001$ ) y tibia proximal ( $p < 0.001$ ). Sorprendentemente, la DMO de las OVX+Olpa fue mayor que la de las SHAM, en tibia total y proximal ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente). La DMO del grupo OVX+T4+Olpa fue significativamente mayor que el de OVX+T4 en fémur ( $p < 0.001$ ), columna lumbar ( $p < 0.001$ ), tibia total ( $p < 0.001$ ), tibia proximal ( $p < 0.0001$ ); asimismo, alcanzó niveles significativamente mayores que la de las SHAM en columna lumbar, tibia total y proximal ( $p < 0.01$  para todas ellas). El presente estudio sugiere que el hueso cortical, en condiciones de deficiencia estrogénica, sería más sensible que el trabecular al efecto de la T4. El Olpa prevendría la pérdida ósea axial y periférica del hueso inducida por un exceso de hormonas tiroideas.

**Abstract** *Olpadronate prevents thyroid hormone-induced cortical and trabecular bone loss in ovariectomized rats.* The aim of the present report was to clarify the effect of excess T4 on axial and peripheral bone mineral density (BMD) in estrogen-depleted rats. The protective effect of olpadronate (Olpa) on axial and peripheral bone mass in thyroxine-treated rats was also investigated. Female Sprague-Dawley rats were used: SHAM, OVX+Vh, OVX+Olpa (0.3 mg/kg/week), OVX+T4 (250 µg/kg/day) and OVX+T4+Olpa rats. OVX+Vh group presented a BMD lower than SHAM in the tibia ( $p < 0.01$ ) but not in femur or lumbar spine; the middle tibia BMD did not change but it was lower at the distal (pns.) and proximal levels ( $p < 0.003$ ) in OVX+Vh. OVX+T4 rats presented a BMD significantly lower than OVX+Vh rats in total tibia ( $p < 0.02$ ), femur ( $p < 0.006$ ) and lumbar spine ( $p < 0.006$ ). Moreover the BMD was lower in all studied areas of the tibia, but it was statistically significant only at the middle level ( $p < 0.004$ ). OVX+Olpa rats had a BMD higher than OVX+Vh rats in femur ( $p < 0.002$ ), lumbar spine ( $p < 0.0001$ ), total ( $p < 0.001$ ) and proximal tibia ( $p < 0.001$ ). Surprisingly, total and proximal tibia BMD values in OVX+Olpa rats presented a BMD significantly higher than OVX+T4 rats in femur ( $p < 0.001$ ), lumbar spine ( $p < 0.001$ ), tibia ( $p < 0.001$ ) and proximal tibia ( $p < 0.0001$ ). It is important to point out that OVX+T4+Olpa BMD was significantly higher than in SHAM rats at the lumbar spine, total and proximal tibia ( $p < 0.01$ ). The present study suggests that although supraphysiological thyroid hormone affected both cortical and trabecular bone, under estrogen-depleted conditions, the cortical bone appears to be more sensitive than the trabecular bone to T4 treatment. We also found that Olpa could prevent the peripheral and axial bone loss induced by thyroid hormone excess.

**Key words:** thyroxine, olpadronate, bone mineral density, osteopenia, ovariectomy

El exceso de hormonas tiroideas acelera el recambio óseo ya que estimula tanto la formación osteoblástica

como la resorción osteoclástica<sup>1</sup> y aunque ambas están aumentadas predomina la resorción<sup>2</sup>. Como además, en el hipertiroidismo existe una reducción en la absorción de calcio<sup>3</sup>, se observa una generalizada disminución en la densidad mineral ósea (DMO)<sup>1,4</sup>.

Varios estudios clínicos mostraron resultados conflictivos respecto del efecto del hipertiroidismo sobre los distintos compartimentos óseos. Algunos investigadores observaron una disminución tanto de hueso cortical como

Recibido: 15-IV-1998

Aceptado: 29-VI-1998

\* Parcialmente presentado al Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research, Seattle USA, 1996.

**Dirección postal:** Dra. Susana N. Zeni, Sección Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina  
Fax: 5-41-963-5777; E-mail: osthclinuba@ciudad.com.ar

trabecular<sup>5</sup> pero otros, sólo en uno de dichos compartimentos<sup>6,7</sup>. Esta diferencia, en parte, parece estar relacionada con el nivel estrogénico del paciente.

Sobre estas bases y teniendo en cuenta que en los primeros estadios de la menopausia existe una pérdida ósea significativa, es importante evaluar la interrelación entre la depleción estrogénica y el hipertiroidismo.

La rata ovariectomizada (OVX) es el animal comúnmente utilizado para evaluar la osteopenia postmenopáusica y recientemente se utilizó la densitometría de doble haz (DXA) para medir la DMO en pequeños animales<sup>8</sup>. En un trabajo experimental previo encontramos que la administración de dosis suprafisiológicas de T4 a ratas OVX durante 5 semanas no producía ninguna disminución adicional en la DMO esquelética total inducida por la OVX<sup>9</sup>. En el presente estudio, utilizando el mismo modelo experimental se evaluó la DMO en distintos sectores del esqueleto como la columna lumbar, el fémur y la tibia totales, así como, la de los segmentos proximal, medio y distal de la tibia con el fin de observar posibles diferencias entre la sensibilidad del hueso cortical y trabecular a las hormonas tiroideas.

Los bifosfonatos son potentes inhibidores de la resorción osteoclástica<sup>10</sup> y se ha demostrado, tanto en estudios clínicos como experimentales, su eficacia en el tratamiento de varios tipos de desórdenes metabólicos asociados con un alto remodelamiento óseo<sup>11, 14</sup>. Entre los bifosfonatos, los aminobifosfonatos parecerían ser uno de los compuestos más potentes<sup>15</sup>. La dimetilación del grupo amino hace que aumente la potencia del pamidronato (APD) para inhibir la resorción, sin ningún efecto negativo sobre la formación ósea<sup>16-18</sup>. Por tal motivo en el presente trabajo también se investigó la eficacia del olpadronato (dimetil APD, Olpa) para prevenir la posible pérdida ósea axial y periférica inducida por un exceso de hormonas tiroideas.

## Materiales y métodos

Detalles del experimento fueron publicados previamente<sup>9</sup>. En síntesis, se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley de 220 ± 2 gr las que fueron OVX o sometidas a una operación simulada (SHAM). Estos animales se dividieron en 5 grupos de 8 animales cada uno. Al segundo día post-cirugía, las ratas se inyectaron intraperitonealmente con: vehículo: 0.001N NaOH/0.9% NaCl (grupos SHAM y OVX+Vh); 250 µg de T4/kg peso/día (OVX+T4); 0.3 mg de Olpa/kg de peso/semana (OVX+Olpa) o ambos T4+Olpa (OVX+T4+Olpa). La T4 fue gentilmente cedida por Glaxo S.A., Argentina y el Olpa por Gador S.A., Argentina. El peso corporal se registró una vez por semana.

Al comienzo del estudio y luego de 5 semanas se evaluó la DMO por DXA utilizando un equipo Lunar DPX-Alfa 8034 provisto de un software especial para pequeños animales. La DMO de las distintas partes se determinó utilizando una ventana (ROI) automática a partir de la imagen del animal analizado. Los coeficientes de variación (CV) para 5 mediciones repetidas "in vivo" con reposición fueron las siguientes: esqueleto total 0.9%; fémur total 0.9%; tibia total 0.8% y columna lumbar

1.8%. Para las distintas áreas de la tibia los CV fueron 3.5%; 2.7% y 1.8% para los sectores proximal, media y distal respectivamente. Con el objeto de minimizar las variaciones interobservador todos los animales se analizaron por el mismo operador.

### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media ± error standard de la media ( $X \pm ES$ ). La diferencia entre los grupos se evaluó por ANOVA utilizando el paquete estadístico Statview™ (Macintosh) con un 95% de nivel de significancia.

## Resultados

Al comienzo de la experiencia todos los grupos tenían el mismo peso corporal promedio (220 ± 2 g) y durante la misma aumentaron de peso<sup>9</sup>. Cabe destacar que el grupo OVX+T4 fue el que presentó el menor aumento de peso promedio.

La Tabla 1 muestra la DMO inicial y final del esqueleto total, fémur y columna L2-L5 mientras que la Tabla 2 muestra la DMO inicial y final de la tibia total y la de sus distintos segmentos para los cinco grupos estudiados.

Al final del estudio, el grupo de ratas OVX+Vh presentó una DMO significativamente menor que la del grupo SHAM, en la tibia total ( $p < 0.01$ ) pero no en fémur ni columna lumbar (Tablas 1 y 2). Por otra parte, la DMO de la tibia media fue similar en ambos grupos mientras que un valor más bajo se observó en la parte distal (225 ± 4 vs 241 ± 10 mg/cm<sup>2</sup>, pns) y proximal del grupo OVX+Vh, alcanzando sólo en este último sector, una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.003$ ) (Tabla 2).

Cuando el grupo OVX+Vh se comparó con el grupo OVX+T4, el primer grupo presentó una DMO significativamente menor a nivel de la tibia total ( $p < 0.02$ ), fémur ( $p < 0.006$ ) y columna lumbar ( $p < 0.006$ ) (Tablas 1 y 2). Además los valores de DMO en el grupo OVX+T4 fueron menores en todos los sectores analizados de la tibia, pero alcanzó un nivel estadísticamente significativo sólo en la parte media ( $p < 0.004$ ) (Tabla 2).

El grupo OVX+Olpa presentó una DMO mayor que el grupo OVX+Vh a nivel del fémur ( $p < 0.002$ ), de la columna lumbar ( $p < 0.03$ ), de la tibia total ( $p < 0.001$ ) y de la tibia proximal ( $p < 0.001$ ) (Tablas 1 y 2). Sorprendentemente, el grupo OVX+Olpa presentó una DMO mayor que el grupo SHAM, a nivel de la tibia total y proximal ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente) (Tabla 2).

El grupo OVX+T4+Olpa presentó una DMO significativamente mayor que el grupo OVX+T4 en todas las regiones analizadas: fémur ( $p < 0.001$ ), columna lumbar ( $p < 0.001$ ) y tibia total ( $p < 0.001$ ). Un resultado similar fue encontrado en la DMO a nivel de la tibia proximal ( $p < 0.001$ ). Es importante puntualizar que la DMO en el grupo OVX+T4+Olpa alcanzó niveles significativamente mayores que los observados en el

TABLA 1.— BMD (media  $\pm$  ES) expresado en mg/cm<sup>2</sup> del esqueleto total, fémur y columna lumbar (L2-L5).

Grupo	Esqueleto total	Fémur	L2-L5
Valor inicial	249 $\pm$ 1	265 $\pm$ 7	222 $\pm$ 4
Valores al final de la experiencia			
SHAM+Vh	273 $\pm$ 3	309 $\pm$ 11	258 $\pm$ 6
OVX+Vh	264 $\pm$ 3 a	285 $\pm$ 7	245 $\pm$ 5
OVX+T4	260 $\pm$ 2 a	256 $\pm$ 6 a, b	221 $\pm$ 5 a, b
OVX+Olpa	277 $\pm$ 2 b, c, d	322 $\pm$ 4 b, c	262 $\pm$ 5 b, c, d
OVX+T4+Olpa	319 $\pm$ 13 a, b, c	320 $\pm$ 11 b, c	292 $\pm$ 12 a, b, c

a: p &lt; 0.05 comparado con SHAM

b: p &lt; 0.05 comparado con OVX+Vh

c: p &lt; 0.05 comparado con OVX+T4

d: p &lt; 0.05 comparado con OVX+T4+Olpa

TABLA 2.— BMD (media  $\pm$  ES) expresado en mg/cm<sup>2</sup> de la tibia total y sus diferentes segmentos

Grupo	Total	Distal	Media	Proximal
Valor inicial	237 $\pm$ 3	213 $\pm$ 8	208 $\pm$ 5	247 $\pm$ 6
Valores al final de la experiencia				
SHAM+Vh	255 $\pm$ 6	241 $\pm$ 10	215 $\pm$ 7	299 $\pm$ 5
OVX+Vh	235 $\pm$ 3 a	225 $\pm$ 4	216 $\pm$ 6	257 $\pm$ 8 a
OVX+T4	220 $\pm$ 4 a, b	216 $\pm$ 6 a	198 $\pm$ 7 a, b	244 $\pm$ 9
OVX+Olpa	272 $\pm$ 3 a, b, c	229 $\pm$ 4	214 $\pm$ 6	334 $\pm$ 4 a, b, c
OVX+T4+Olpa	294 $\pm$ 16 a, b, c	234 $\pm$ 7	220 $\pm$ 6	359 $\pm$ 20 a, b, c

a: p &lt; 0.05 comparado con SHAM

b: p &lt; 0.05 comparado con OVX+Vh

c: p &lt; 0.05 comparado con OVX+T4

d: p &lt; 0.05 comparado con OVX+T4+Olpa

grupo SHAM a nivel de la columna lumbar, tibia total y proximal (p < 0.01 para todas ellas) (Tabla 1 y 2).

## Discusión

En los primeros estadios de la depleción estrogénica por una menopausia artificial<sup>19, 20</sup> o natural<sup>21, 22</sup>, se acelera la pérdida de hueso por un incremento en el remodelamiento óseo, donde la resorción excede a la formación. Previamente encontramos que las ratas OVX+Vh tenían una DMO del esqueleto total significativamente menor que las ratas SHAM (Tabla 1)<sup>9</sup>. El

presente trabajo muestra que aunque la DMO del fémur y de la columna lumbar del grupo OVX+Vh fue menor que en las SHAM, sólo en la tibia alcanzó una diferencia estadísticamente significativa. Estudios histomorfométricos previos en ratas OVX mostraron una osteopenia más pronunciada en la tibia, especialmente a nivel proximal<sup>23</sup> comparada con las vértebras lumbares<sup>24</sup>. Además, en el presente estudio, las subáreas de la tibia fueron afectadas diferentemente por la OVX; mientras que la DMO de los segmentos proximal y distal (ricos en hueso trabecular) fueron significativamente menores que la del grupo SHAM, la tibia media (predominantemente hueso cortical) no mostró cambios significativos. En con-

cordancia, Wronski et al.<sup>25</sup> observaron que las ratas OVX perdían hueso trabecular rápidamente luego de la depleción estrogénica. Asimismo, estudios clínicos sugieren que en las etapas iniciales de la menopausia existiría una mayor sensibilidad del hueso trabecular a la deficiencia estrogénica<sup>26</sup>. Las razones de por qué el hueso cortical es aparentemente resistente a perder masa ósea luego de la OVX, así como por qué el hueso trabecular de las vértebras no sería tan sensible a la pérdida como el de las metáfisis de los huesos largos, no está clara. Wronski et al.<sup>27</sup> sugieren que los cambios osteopénicos a nivel de la tibia proximal se incrementan debido a la alta velocidad basal de remodelamiento óseo que tiene lugar en dicha región.

La pérdida de hueso asociada a las hormonas tiroideas tiene lugar por un incremento en el remodelamiento óseo donde la resorción es mayor que la formación ósea<sup>28</sup>. Estudios en humanos sugieren que las hormonas tiroideas inducirían una pérdida de hueso axial y apendicular en mujeres postmenopáusicas<sup>26</sup> y que su impacto sería mayor que en las premenopáusicas<sup>29</sup>. Previamente publicamos que la ovariectomía disminuía la DMO del esqueleto total y que el tratamiento con T4, en la dosis utilizada, no producía una disminución mayor<sup>9</sup>. Sin embargo, los cambios en la masa ósea no ocurren por igual en todo el esqueleto. El hueso trabecular, aproximadamente 20% del esqueleto, contribuye con un 80% al remodelamiento óseo; mientras que el hueso cortical, 80% del esqueleto sólo contribuye con un 20%. Si bien la rata no presenta el sistema de canales haversianos, se acepta que igualmente poseen ciclos de remodelamiento<sup>18</sup> y que el modelo de pérdida ósea es similar al del humano. En el presente estudio al analizar las diferentes áreas del esqueleto, tanto el hueso cortical como el trabecular se ven afectados por el tratamiento con T4. Así, la administración de T4 a ratas OVX afectó significativamente la columna lumbar (30-60% de hueso trabecular), el fémur y la tibia total (20-40% de hueso trabecular) simulando su acción en humanos. Es importante señalar que además el sector medio de la tibia (predominantemente cortical) presentó una disminución significativa en la DMO. Este hecho confirma hallazgos radiológicos previos en humanos<sup>30</sup> y que sumado a que no existió diferencia a nivel de la tibia media entre los grupos SHAM y OVX+Vh, sugeriría que en condiciones de deficiencia estrogénica el hueso cortical sería más sensible que el trabecular al tratamiento con dosis suprafisiológicas de T4. Además, el gran incremento en el remodelamiento óseo que ocurre durante las 5 primeras semanas posteriores a la OVX enmascararía los efectos de la T4 a nivel de un sitio metabólicamente activo como la tibia proximal, ya que, a dicho nivel no existió diferencias estadísticamente significativas entre las ratas OVX+Vh y OVX+T4. Estos resultados contrastan con dos estudios previos en ratas OVX tratadas con T4. En

uno de ellos no disminuyó la masa femoral<sup>31</sup> y en el otro no disminuyó ni la del fémur ni la del hueso vertebral<sup>32</sup>. En ratas macho orquidectomizadas tratadas con T4 los resultados también resultaron conflictivos. Ongphiphe-dhanakul et al.<sup>33</sup> sólo encontraron una disminución en la DMO femoral; Rosen et al.<sup>34</sup> en fémur y columna y finalmente Balena et al.<sup>27</sup> observaron una disminución significativa en la tibia y columna con T4. La razón de estas discrepancias se deberían a varios factores como el diseño experimental, la dosis de hormona tiroidea usada, la duración de la experiencia, el sexo y/o edad de los animales utilizados.

Previamente encontramos que el Olpa prevenía la pérdida ósea en el esqueleto total de ratas OVX tratadas o no con T4<sup>9</sup>. Además, la DMO del esqueleto total fue significativamente mayor en las ratas OVX+T4+Olpa que en los controles<sup>9</sup>. En concordancia con ello, en el presente trabajo la DMO en el grupo OVX+T4+Olpa fue significativamente mayor que en ratas SHAM a nivel de la columna, de la tibia total y proximal y en el grupo OVX+Olpa, solamente a nivel de la tibia total y proximal. Una posible explicación para estos hallazgos sería que la columna lumbar y la metáfisis de la tibia proximal son ricas en hueso trabecular, metabólicamente más activo que el hueso cortical. El tratamiento con Olpa bloquearía la resorción ósea, mientras que la formación continúa rellenando los sitios de remodelamiento existentes<sup>35</sup>. Como resultado de ello, al final del período experimental, se obtendría un balance positivo y por lo tanto una DMO mayor que en el grupo SHAM, especialmente en los sitios metabólicamente más activos que como mencionamos previamente son los que contienen hueso trabecular.

En conclusión, el presente estudio sugiere que las dosis suprafisiológicas de hormona tiroidea afecta tanto el hueso cortical como el trabecular. Sin embargo, en un estado de deficiencia estrogénica, el hueso cortical sería el más sensible. El Olpa prevendría tanto la pérdida ósea axial como periférica del hueso inducida por un exceso de hormonas tiroideas. Si bien son necesarios estudios adicionales, estos resultados facilitarían la terapia en pacientes que requieren dosis supresivas de TSH, para prevenir la pérdida ósea por exceso de hormonas tiroideas.

**Agradecimiento:** Los autores agradecen a Cristina Arakelian y María del Carmen Degrandi por su asistencia técnica. Este trabajo fue en parte subsidiado por la Fundación Argentina de Osteología y por un PID del CONICET.

## Bibliografía

1. Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin NA* 1990; 19: 35-63.
2. Mosekilde L, Melsen F. A tetracycline-based histomor-

- phometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. *Acta Med Scand* 1978; 204: 97-102.
3. Baran DT, Braverman LE. Thyroid hormones and bone mass. Editorial. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 71: 1182-3.
  4. Meunier PJ, Bianchi GGS, Edouard CM, Bernard JC, Courpron P, Vignon GE. Bony manifestations of thyrotoxicosis. *Orthop Clin NA* 1972; 3: 745-74.
  5. Adlin EV, Maurer AH, Marks AD, Channick BJ. Bone mineral density in postmenopausal women treated with L-thyroxine. *Am J Med* 1991; 90: 360-6.
  6. Stall GM, Harris S, Sokoll LJ, Dawson-Hughes B. Accelerated bone loss in hypothyroid patients overtreated with L-thyroxine. *Ann Intern Med* 1990; 113: 265-9.
  7. Taelam P, Kaufman JM, Janssens X, Vandercauter H, Vermeulen A. Reduced forearm bone mineral content and biochemical evidence of increased bone turnover in women with euthyroid goiter treated with thyroid hormone. *Clin Endocrinol* 1990; 33: 107-17.
  8. Rosen HN, Middlebrooks VL, Sullivan EK, Rosenblatt M, Maitland LA, Moses AC et al. Subregion analysis of the rat femur: a sensitive indicator of changes in bone density following treatment with thyroid hormone or bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1994; 55: 173-5.
  9. Zeni SN, Gómez Acotto C, Mautalen C. Olpadronate prevent thyroxine induced-osteopenia in OVX rats. *Bone* 1997; 21: 329-33.
  10. Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient. 2nd. ed. New York: The Parthenon Publishing Group 1995; p 45.
  11. Yamamoto M, Markatos A, Seedor JG, Masarachia P, Gentile M, Rodan G. et al. The effects of the aminobisphosphonate Alendronate on thyroid hormone-induced osteopenia in rats. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 278-82.
  12. Fromm GA, Vega E, Plantalech L, Galich AM, Mautalen CA. Differential action of pamidronate on trabecular and cortical bone in women with involuntional osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1991; 1: 129.
  13. Mautalen CA, González D, Ghiringhelli G. Efficacy of the bisphosphonate APD in the control of Paget's bone disease. *Bone* 1985; 6: 429.
  14. Bickerstaff DR, O'Doherty DP, McCloskey EV, Hamdy NA, Mian M, Kanis JA. Effects of amino-butylidene disphosphonate in hypercalcemia due to malignancy. *Bone* 1991; 12: 17-20.
  15. Schenk R, Egli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tiss Int* 1986; 38: 42-9.
  16. Bonekamp PM, Lowick CW, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep ML, Bijvoet OL. Enhancement of the inhibitory action of APD on the transformation of osteoclast precursors into resorbing cells after dimethylation of the amino group. *Bone Miner* 1987; 2: 29-42.
  17. Papapoulos SE, van Holten-Verzantvoort AT. Modulation of tumor-induced bone resorption by bisphosphonates. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43: 131-6.
  18. Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 1992; 18: 227-36.
  19. Reeve J. Bone turnover and trabecular plate survival after artificial menopause. *Br Med J Clin Res* 1987; 295: 757-60.
  20. Stepan JJ, Pospichal J, Schreiber V, Kanka J, Mensik J, Presl J, et al. The application of plasma tartrate-resistant acid phosphatase to assess changes in bone resorption in response to artificial menopause and its treatment with estrogen or norethisterone. *Calcif Tissue Int* 1989; 45: 273-80.
  21. Uebelhart D, Schlemmer A, Johansen JS, Bineyts E, Christiansen C, Delmas PD. Effect of menopause replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 367-73.
  22. Kelly PJ, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA. Age and menopause-related changes in indices of bone turnover. *Endocrinol Metab Clin NA* 1989; 69: 1160-5.
  23. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 324-8.
  24. Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histological evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1986; 7: 119-23.
  25. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15: 175-92.
  26. Diamont T, Nevy I, Hales I. A therapeutic dilemma: Suppressive doses of thyroxine significantly reduce bone mineral measurements in both premenopausal and postmenopausal women with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 1184-8.
  27. Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1989; 10: 295-301.
  28. Balena R, Markatos A, Gentile M, Masarachia P, Seedor JG, Rodan GA, et al. The aminobisphosphonate alendronate inhibits bone loss induced by thyroid hormone in the rat: comparison between effects on tibiae and vertebrae. *Bone* 1993; 14: 499-504.
  29. Faber J, Galloc AM. Changes in bone mass during prolonged subclinical hyperthyroidism due to L-thyroxine treatment: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 350-6.
  30. Meema HE, Schatz DL. Simple radiological demonstration of cortical bone loss in thyrotoxicosis. *Radiology* 1970; 97: 9-15.
  31. Yamaura M, Nakamura T, Kanou A, Miura T, Ohara H, Suzuki K. The effect of 17 $\beta$ -estradiol treatment on the mass and the turnover of bone in ovariectomized rats taking a mild dose of thyroxin. *Bone Miner* 1994; 24: 33-42.
  32. Ongphiphadhanakul B, Jenis L, Braverman L, Alex S, Stein G, Lian J. et al. Etidronate inhibits the thyroid hormone-induced bone loss in rats assessed by bone mineral density and messenger ribonucleic acid markers of osteoblast and osteoclast function. *Endocrinology* 1993; 133: 2502-7.
  33. Ongphiphadhanakul B, Alex S, Braverman L, Baran D. Excessive L-thyroxine Therapy decreases femoral bone mineral densities in the male rat: Effect of hypogonadism and calcitonin. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1227-31.
  34. Rosen H, Sullivan E, Middlebrooks L, Zeind A, Gundberg C, Dresner-Pollak R et al. Parenteral pamidronate prevents thyroid hormone-induced bone loss in rats. *J Bone Min Res* 1993; 8: 1255-61.
  35. Fleisch H. Bisphosphonates: pharmacology and use in the treatment of tumor induced hypercalcemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991; 42: 919-44.