



## ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

# EFFECTOS *IN VIVO* DEL RANELATO DE ESTRONCIO SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATAS DIABÉTICAS

Agustina Berenice Lino, Juan Manuel Fernández, María Silvina Molinuevo, Ana María Cortizo, Antonio Desmond McCarthy \*

Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (LIOMM). Calle 47 y 115, (1900) La Plata, Argentina.

### Resumen

La diabetes mellitus (DM) crónica se asocia con reducción en el contenido mineral óseo (osteopenia y osteoporosis). El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción del ranelato de estroncio (RaSr) administrado por vía oral a animales control y diabéticos, sobre el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea (CPMO). Dieciséis ratas Wistar macho jóvenes se dividieron en dos grupos: controles (C) y diabéticas (D) con destrucción parcial de células  $\beta$ -pancreáticas mediante inyecciones intraperitoneales consecutivas de nicotinamida y estreptozotocina. Siete días después de la inyección, cada grupo se subdividió: sin tratamiento, o tratadas oralmente con RaSr (625 mg/kg/día) durante seis semanas, luego de lo cual los animales fueron sacrificados. Las CPMO se obtuvieron de ratas de los cuatro grupos, por lavados del canal diafisario medular (húmero o fémur o ambos) y cultivo hasta confluencia en DMEM-10% FBS. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Luego las CPMO se replaquearon e incubaron en un medio osteogénico durante 14 días (fosfatasa alcalina [FAL] y colágeno tipo 1) o 21 días (mi-

neralización). Las CPMO del grupo C+RaSr mostraron un aumento significativo versus control en la proliferación (133%) y en la diferenciación osteogénica (colágeno 143%, FAL 168%, mineralización 117%). La DM (grupo D) disminuyó significativamente la proliferación y diferenciación osteoblástica de las CPMO. El tratamiento con RaSr (grupo D+RaSr) previno completamente estos efectos antiosteogénicos de la DM. Así, en nuestro modelo experimental *in vivo*, la DM disminuye el potencial osteogénico de CPMO, efecto que puede ser prevenido por un tratamiento oral con RaSr.

**Palabras clave:** diabetes mellitus, osteoporosis, ranelato de estroncio, células progenitoras de médula ósea, osteoblasto.

### Abstract

#### IN VIVO EFFECTS OF STRONTIUM RANELATE ON BONE MARROW PROGENITOR CELLS OF DIABETIC RATS

*Chronic diabetes mellitus (DM) is associated with a reduction in bone mineral content (osteopenia and osteoporosis). The object of this study was to evaluate the in vivo effect of*

\* Correo electrónico: [mccarthy@biol.unlp.edu.ar](mailto:mccarthy@biol.unlp.edu.ar)

*the anti-osteoporotic drug strontium ranelate (SrRa) administered orally to control and diabetic animals, on the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells (BMPC). Sixteen young male Wistar rats were divided into two groups: control (C) and diabetic with partial beta-cell destruction via consecutive intra-peritoneal injections of nicotinamide and streptozotocin (D). Seven days post-injection, each group was sub-divided: without treatment, or oral treatment with SrRa (625 mg/kg/day) for six weeks, after which the animals were euthanised (groups C, C+SrRa, D, D+SrRa). BMPC were obtained from rats of all four groups by flushing of the diaphysary canal (humerus and/or femur). Adherent cells were then cultured until confluence in DMEM-10% FBS. Cell proliferation was evaluated with the MTT mitogenic bioassay. BMPC were replated and incubated in an osteogenic medium for 14 days (determination of alkaline phosphatase [ALP] and type-1 collagen) or 21 days (evaluation of mineralisation). BMPC from C+SrRa rats showed a significant increase versus control in proliferation (133%) and in osteogenic differentiation (collagen 143%, ALP 168%, mineralisation 117%). Induction of diabetes (group D) significantly decreased the proliferation and osteoblastic differentiation of BMPC. Treatment of diabetic animals with SrRa (group D+SrRa) completely prevented these anti-osteogenic effects of Diabetes. Thus, in our experimental in vivo model, Diabetes decreases the osteogenic potential of BMPC, an effect that can be prevented by oral treatment with strontium ranelate.*

**Key words:** *diabetes mellitus, osteoporosis, strontium ranelate, bone marrow progenitor cells, osteoblast.*

## Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una patología caracterizada por hiperglucemia persistente, que en nuestro país afecta al 7% de la población adulta. Desde hace aproxi-

madamente 20 años se ha asociado la DM crónica con alteraciones esqueléticas y del metabolismo fosfocálcico, con reducción en el contenido mineral óseo (osteopenia u osteoporosis), aumento en la incidencia de fracturas y disminución en la consolidación de las mismas.<sup>1,2</sup> Los efectos crónicos sistémicos de la DM están mediados en parte por la acumulación tisular de productos de glicación avanzada de proteínas (AGEs) y su unión a receptores específicos. En el hueso, los osteoblastos expresan al receptor RAGE, y su activación por AGEs acumulados en el colágeno induce una inhibición en la proliferación, diferenciación y mineralización osteoblástica.<sup>3</sup> Los osteoclastos también expresan el receptor RAGE.<sup>4</sup> En estas células, los AGEs pueden disminuir la capacidad de resorción del hueso.<sup>5,6</sup> En conjunto, estos resultados sugieren que las alteraciones esqueléticas asociadas con la DM se pueden deber a una disminución del recambio óseo, con una consiguiente acumulación de imperfecciones que incrementa así el riesgo de fracturas. Dichas fracturas serán difíciles de consolidar al estar deprimida la formación ósea osteoblástica. En estudios previos con ratas diabéticas hemos demostrado que esta patología induce efectos deletéreos sobre la microarquitectura de huesos largos, que se asocian con una disminución en el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea (CPMO), mediado por un descenso en la relación Runx-2/PPAR- $\gamma$  y un incremento en la expresión de RAGE.<sup>7</sup>

El ranelato de estroncio (RaSr) es uno de los medicamentos disponibles para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusicas,<sup>8</sup> y se ha probado su eficacia en ambos sexos y en un amplio rango etario. En este fármaco, dos cationes de estroncio (principio activo) se asocian de manera estable con el ácido ranélico.<sup>9</sup> El RaSr se administra por vía oral, y en el hueso el estroncio se incorpora a la hidroxiapatita sustituyen-



do al calcio. El RaSr actúa *in vitro* de forma dual, incrementando la formación ósea mediada por osteoblastos y disminuyendo la resorción osteoclástica. Actúa en parte como agonista del receptor sensor de calcio (CaSR), molécula acoplada a proteínas G que es expresada en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.<sup>9</sup> En los osteoclastos, el reconocimiento del estroncio por el CaSR inhibe en forma directa la diferenciación osteoclástica e induce su apoptosis. En los osteoblastos, el estroncio también actúa vía CaSR, activando las MAPK y estimulando en forma directa la proliferación, diferenciación y mineralización osteoblástica, así como incrementando la relación OPG/RANKL. A su vez, este mayor cociente OPG/RANKL provoca indirectamente una reducción en el reclutamiento y actividad de osteoclastos. En estudios recientes *in vitro*, nuestro grupo demostró que el RaSr previene los efectos antiosteogénicos de los AGEs sobre osteoblastos en cultivo.<sup>10</sup>

En modelos de osteoporosis experimental *in vivo* se ha probado que el RaSr genera un aumento en la densidad mineral ósea (DMO) y una mejoría en la microarquitectura y resistencia a fracturas.<sup>11</sup> En seres humanos se ha demostrado la eficacia antifractura del RaSr, sostenida hasta 8 años.<sup>8</sup> Aunque en general es un fármaco bien tolerado, recientemente se lo ha asociado con eventos cardiovasculares adversos en población vulnerable,<sup>12</sup> por lo cual actualmente se encuentra en discusión su pertinencia para el tratamiento de osteopatías en pacientes con DM.

En este trabajo se evaluó el efecto *in vivo* del estroncio sobre células progenitoras de médula ósea (CPMO), en un modelo animal de DM por destrucción parcial de la masa de células  $\beta$  del páncreas. El estroncio se administró por vía oral como RaSr en ratas con DM o sin ella, para evaluar postratamiento su efecto sobre el potencial osteogénico de CPMO aisladas de la médula ósea de huesos largos.

## Material y métodos

### Animales y tratamientos

Se utilizaron ratas macho de tres meses de edad de la cepa WKAH/Hok (190-210 g), mantenidas en un bioterio climatizado de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, alimentadas con una dieta estándar y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la *Guía de manejo y uso de animales de laboratorio*,<sup>13</sup> bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales –Disposición ANMAT 6677/10– e internacionales –Código de Núremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones–. El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de nuestra institución (Número de Protocolo 001-05-15). Se utilizaron 16 animales, los cuales fueron divididos inicialmente en 2 grupos: controles (C) y diabéticas con destrucción parcial de la masa de células  $\beta$  (D) por inyecciones intraperitoneales consecutivas de 75 mg/kg de nicotinamida y 60 mg/kg de estreptozotocina.<sup>14</sup> Luego de una semana, a los animales inyectados se les midió la glucemia para confirmar la inducción de diabetes. A continuación, cada grupo se subdividió en dos subgrupos de 4 animales cada uno: sin tratamiento farmacológico, o tratados con 625 mg/kg/día de ranelato de estroncio<sup>15</sup> en el agua de bebida (RaSr), durante 6 semanas. Este tiempo se definió en función de la duración de un ciclo de remodelado óseo en la rata, que es de 4 semanas. Así, finalmente quedaron definidos cuatro grupos experimentales: C, C+RaSr, D, D+RaSr. Al final de todos los tratamientos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia con xilazina y ketamina. Antes del sacrificio, en los grupos C y D se extrajo sangre bajo anestesia por punción de la vena cava inferior y se separó el suero por centrifugación. En el suero se evaluaron: glucosa (Wiener Lab, Argentina) e insulina (ELISA para insulina de rata, ALPCO, Estados Unidos).

### **Aislamiento y cultivo de CPMO**

Las CPMO se obtuvieron a partir de lavados del canal diafisario medular (húmero y/o fémur) de las ratas de los diferentes grupos experimentales, según la técnica descrita previamente.<sup>16</sup> Fueron cultivadas en un medio DMEM-10% FBS penicilina/estreptomicina (medio basal) a 37 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar la confluencia (10 días de cultivo). En algunos casos y para inducir su diferenciación osteoblástica, las CPMO fueron replaqueadas a baja densidad e incubadas con un medio basal adicionado con 50 µg/ml de ácido ascórbico y 25 mM de β-glicerofosfato.

### **Proliferación celular**

Para evaluar el efecto *in vivo* del RaSr sobre la capacidad de proliferación, las CPMO de todos los grupos fueron replaqueadas y cultivadas durante 2 horas y 1, 2, 3 y 6 días en medio basal. Para medir el crecimiento celular se empleó el método de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol (MTT), por la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial de células viables, en un compuesto coloreado de color azul (formazán). El formazán es detectado espectrofotométricamente a 570 nm luego de haberse provocado su disolución con dimetilsulfoxido (DMSO).<sup>17</sup>

### **Actividad de fosfatasa alcalina**

Luego de 14 días de diferenciación osteoblástica, la monocapa de células se lavó con PBS y se solubilizó en Tritón X100 al 0,1%. Una alícuota del extracto celular se usó para determinar proteínas por el método de Bradford. La actividad de fosfatasa alcalina se midió espectrofotométricamente utilizando p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como sustrato. El p-nitrofenol (producto coloreado de la hidrólisis) se determinó por absorbancia a 405 nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37 °C en *buffer* pH 10,4 durante un período de tiempo predeterminado.<sup>18</sup> Los resultados se muestran como nmol pNP/min mg proteína.

### **Producción de colágeno tipo 1**

Luego de 14 días de diferenciación osteoblástica, la producción de colágeno tipo 1 se determinó utilizando un microensayo colorimétrico mediante la técnica de Sirius Red: las células se fijaron con solución de Bouin (ácido pícrico: formaldehído 35%: ácido acético glacial 15:5:1) durante 1 hora. Se lavó la monocapa celular con ácido clorhídrico 0,1 N y se tiñó con una solución de Sirius Red por 1 hora. El material teñido se disolvió en 1 ml de hidróxido de sodio 0,1 N y se midió su absorbancia a 550 nm. Las medidas se interpolaron en una curva de calibración, expresando los resultados como µg de colágeno/mg de proteína.<sup>19</sup>

### **Mineralización**

Los depósitos de calcio extracelular (nódulos de mineralización) se evaluaron luego de 21 días de cultivo en el medio de diferenciación osteoblástico. Brevemente, la monocapa celular se fijó con formalina y se tiñó con rojo de alizarina S. Los depósitos de calcio teñidos se extrajeron con 1 ml de solución de hidróxido de sodio 0,1 N y la densidad óptica se midió a 548 nm.<sup>19</sup> Los resultados se expresan como µg Ca/mg proteína.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media±SEM. Las diferencias entre grupos fueron analizadas por el test de ANOVA (*one-way*) y el test de Tukey. Se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

### **Resultados y discusión**

En este trabajo evaluamos el efecto de un tratamiento oral durante seis semanas con ranelato de estroncio (RaSr) en ratas controles y diabéticas, sobre el potencial osteogénico de CPMO obtenidas y cultivadas poseutanasia de los animales. Para la inducción de DM utilizamos un modelo de insulinopenia por destrucción parcial de la masa de célu-

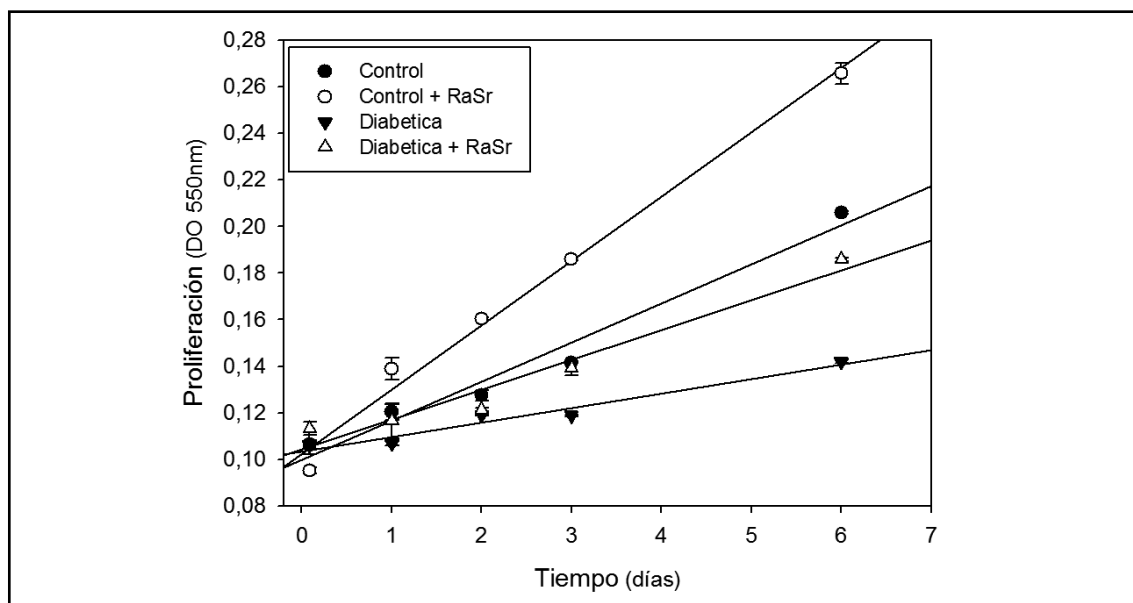


las  $\beta$  de los islotes del páncreas. En nuestro modelo de diabetes, la nicotinamida previene parcialmente la depleción de NAD inducida por la estreptozotocina sobre las células  $\beta$ , disminuyendo así su efecto tóxico.<sup>14</sup> La glucemia plasmática hallada fue de  $3,67 \pm 0,44$  g/l en el grupo D, versus  $1,46 \pm 0,15$  g/l en el grupo C. La insulinemia encontrada fue de  $1,31 \pm 0,15$  ng/ml (grupo C) y de  $0,27 \pm 0,15$  ng/ml (grupo D). El tratamiento oral con RaSr no modificó los valores de glucemia e insulinemia.

Una vez obtenidas las CPMO, en primer lugar determinamos el efecto *in vivo* del RaSr sobre su proliferación basal (es decir, de las células cultivadas en un medio basal). Como puede observarse en la Figura 1, encontramos: a) un incremento en la capacidad de proliferación de las CPMO obtenidas de animales no diabéticos tratados con RaSr (grupo C+RaSr:  $128 \pm 2\%$  respecto de C,  $p < 0,001$ ) y una disminución en la proliferación de CPMO de ratas diabéticas (grupo D:  $67 \pm 3\%$  respecto

de C,  $p < 0,001$ ). Fundamentalmente, el tratamiento de animales diabéticos con RaSr (grupo D+RaSr) permitió recuperar la capacidad de proliferación de las CPMO a valores del control ( $91 \pm 3\%$  respecto de C, diferencia no significativa).

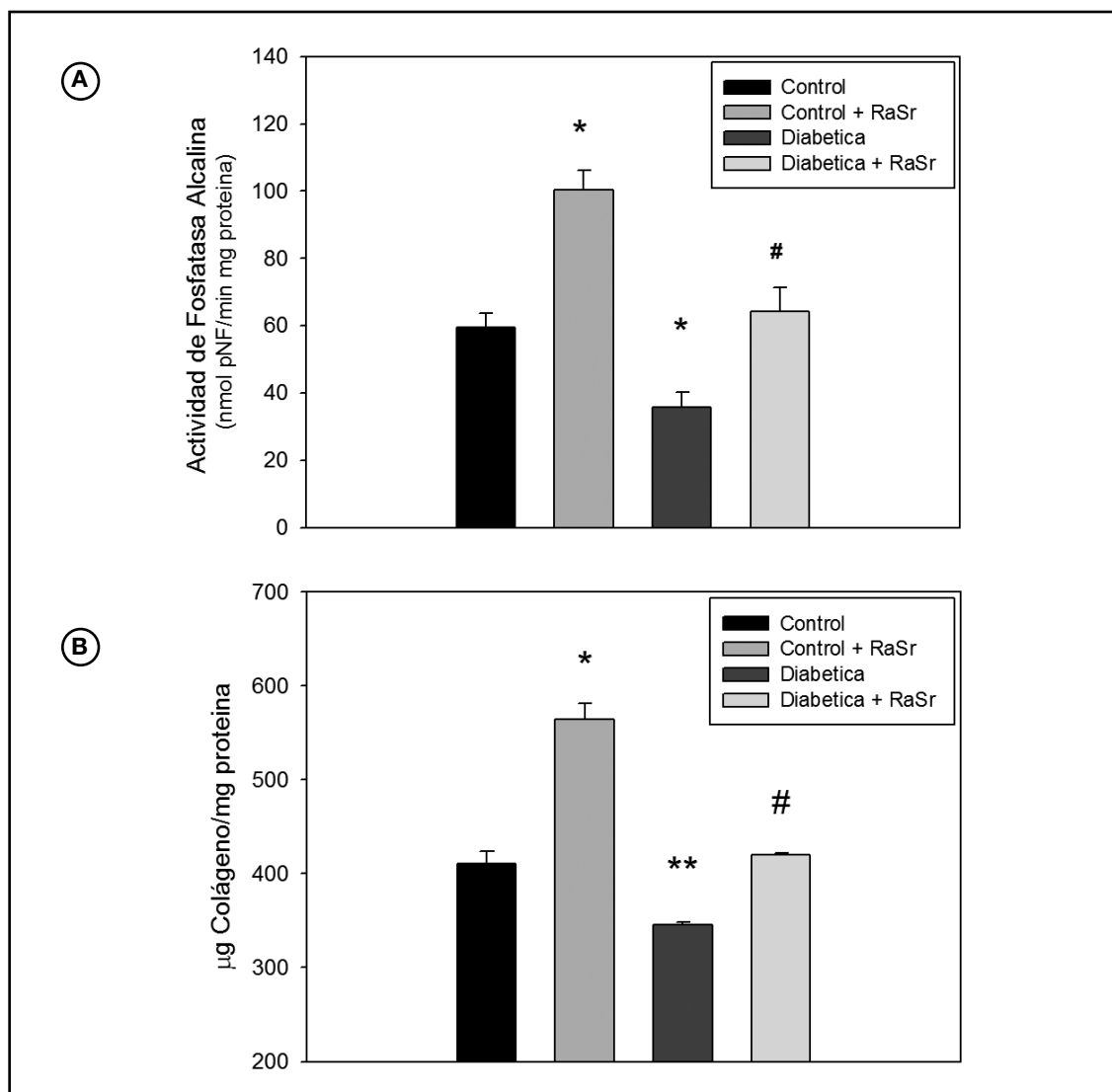
En una segunda etapa cultivamos las CPMO obtenidas de animales de los cuatro grupos en un medio basal adicionado con ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato, con el objeto de inducir su diferenciación osteogénica *in vitro*. Estos cultivos fueron realizados durante 14 días (Figura 2A, actividad específica de FAL; Figura 2B, producción de colágeno de tipo 1) o durante 21 días (Figura 3, acumulación de nódulos extracelulares de hidroxapatita). Los resultados obtenidos fueron concordantes entre sí y, además, consistentes con los observados para la proliferación celular. Las CPMO del grupo C+RaSr mostraron un aumento significativo en la diferenciación osteogénica (colágeno 143% vs. C, FAL



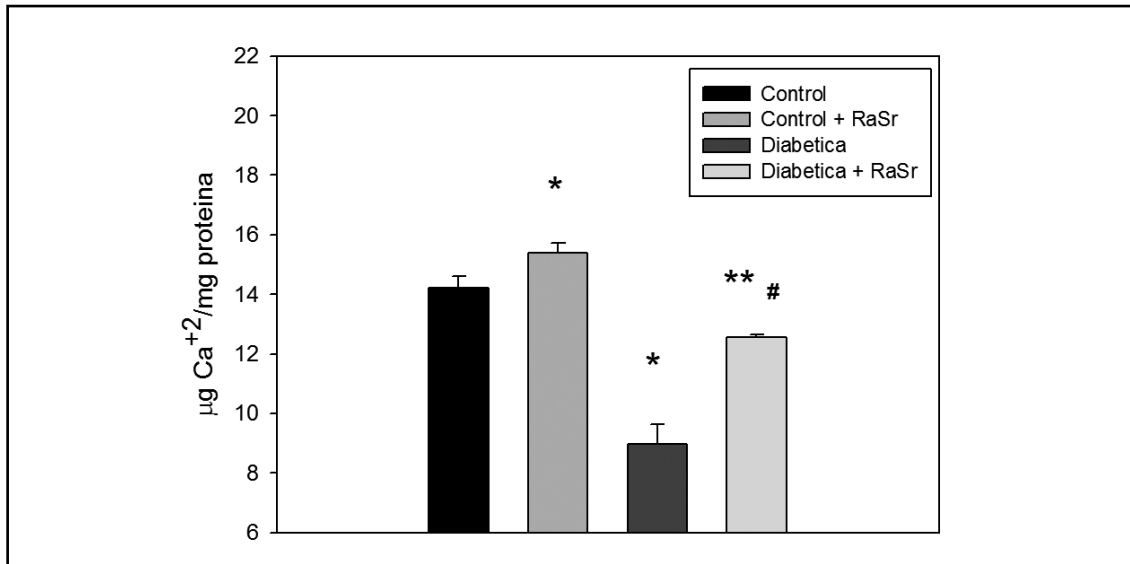
**Figura 1. Efectos de la diabetes y el tratamiento con ranelato de estroncio sobre la proliferación de células progenitoras de médula ósea (CPMO).** Se obtuvieron CPMO a partir de los cuatro grupos experimentales y se cultivaron en medio basal durante 2 horas y 1, 2, 3 y 6 días, evaluando el número de células viables mediante el ensayo de MTT. La proliferación celular se estimó a partir de la pendiente de las rectas obtenidas para cada grupo experimental.

168% vs. C, mineralización 117% vs. C). Por otro lado, la diabetes mellitus (grupo D) disminuyó significativamente la diferenciación osteoblástica de las CPMO (colágeno 83% vs. C, FAL 61% vs. C, mineralización 62% vs. C). El tratamiento con RaSr (grupo D+RaSr) previno significativamente estos efectos anti-osteoblásticos de la DM.

En estudios previos utilizando este mismo modelo *in vivo* de diabetes insulínopénica <sup>7</sup> demostramos un aumento de la expresión del receptor RAGE en las CPMO. En esta patología existe una acumulación de AGEs sobre el colágeno óseo, y así encontramos que la mayor interacción AGEs-RAGE inducía en las CPMO una disminución en la expresión del



**Figura 2. Efectos de la diabetes y el tratamiento con ranelato de estroncio sobre la diferenciación osteoblástica de células progenitoras de médula ósea (CPMO).** Las CPMO aisladas de los cuatro grupos experimentales fueron cultivadas durante 14 días en un medio de diferenciación osteoblástico. Al término de ese período, se determinó la actividad específica de fosfatasa alcalina (A) y la producción de colágeno tipo 1 (B). \*  $p < 0,05$  vs. grupo C; \*\*  $p < 0,01$  vs. grupo C; #  $p < 0,001$  vs. grupo D.



**Figura 3. Efectos de la diabetes y el tratamiento con ranelato de estroncio sobre la mineralización de células progenitoras de médula ósea (CPMO).** Las CPMO aisladas de los cuatro grupos experimentales fueron cultivadas durante 21 días en un medio de diferenciación osteoblástico. Al término de ese período, se determinó la formación de nódulos de mineralización extracelulares. \*  $p < 0,05$  vs. grupo C; \*\*  $p < 0,01$  vs. grupo C; #  $p < 0,001$  vs. grupo D.

factor de transcripción osteoblástico Runx-2 y un aumento en el factor proadipocítico PPAR- $\gamma$ , lo cual disminuyó su potencial osteogénico y provocó alteraciones deletéreas en la microarquitectura de huesos largos. En otro estudio reciente *in vitro* probamos que el ranelato de estroncio, en concentraciones similares a las que se han descrito en el plasma de mujeres posmenopáusicas en tratamiento antiosteoporótico con este fármaco, prevenía los efectos pro-inflamatorios y antiosteogénicos de los AGEs sobre osteoblastos en cultivo.<sup>10</sup>

Nuestras observaciones previas están de acuerdo con las del presente trabajo y sugieren que el estroncio puede inducir el compromiso de células osteoprogenitoras hacia el linaje osteoblástico y la formación de hueso, ejerciendo efectos directos sobre células óseas, aun en el contexto de la acumulación de AGEs inducida por DM. Específicamente,

en el presente trabajo hemos podido verificar en un modelo de diabetes con disminución en la reserva pancreática de insulina, que el tratamiento oral con ranelato de estroncio puede prevenir parcial o totalmente los efectos antiosteogénicos de dicha patología metabólica sobre CPMO.

El ranelato de estroncio se encuentra aprobado para su utilización en varios países incluida la Argentina (aunque no en los Estados Unidos). Sin embargo, a instancias del reciente reporte del Comité para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia Europeo (PRAC), a nivel global se han implementado cambios regulatorios en el uso de este medicamento. Ello implica su utilización actual solo para pacientes con osteoporosis severa para los cuales no sea posible un tratamiento antiosteoporótico alternativo, y adicionalmente que no posean contraindicaciones que incluyen: hipertensión no controlada, o ante-

cedentes previos o actuales de cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica o enfermedad cerebrovascular.<sup>12</sup> Dado que la DM es un factor de riesgo cardiovascular, la indicación de este fármaco en el contexto de dicha patología debe evaluarse muy cuidadosamente.

En conclusión, en nuestro modelo experimental *in vivo*, la diabetes mellitus disminuye el potencial osteogénico de CPMO, efecto que puede ser prevenido por un tratamiento oral con ranelato de estroncio.

### Agradecimientos

Este trabajo fue subsidiado por la ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y

Tecnológica, PICT 2012-0053), por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires. ABL es becaria de la ANPCyT; JMF y MSM son miembros de la Carrera del Investigador del CONICET; AMC es miembro de la Carrera del Investigador de la CIC, y ADM es Profesor Adjunto con dedicación semiexclusiva de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

(Recibido: junio 2016.  
Aceptado: agosto 2016.)

### Referencias

1. Seino Y, Ishida H. Diabetic osteopenia: pathophysiology and clinical aspects. *Diabetes Metab Rev* 1995; 11:21-35.
2. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:1502-10.
3. McCarthy A, Etcheverry S, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio D, Cortizo AM. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol* 2001;2:16.
4. Zhou Z, Immel D, Xi CX, et al. Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. *J Exp Med* 2006; 203:1067-80.
5. Valcourt U, Merle B, Gineyts E, Viguet-Carrin S, Delmas PD, Garnero P. Non-enzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation. *J Biol Chem* 2007; 282:5691-703.
6. Gangoiti MV, Arnol V, Cortizo AM, McCarthy AD. Advanced Glycation Endproducts and Alendronate Differentially Inhibit early and Late Osteoclastogenesis in vitro. *J Diabetes Metab* 2013;4:6.
7. Tolosa MJ, Chuguransky SR, Sedlinsky C, et al. Insulin-deficient diabetes-induced bone microarchitecture alterations are associated with a decrease in the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells: Preventive effects of metformin. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 101:177-86.
8. Reginster JY, Bruyère O, Sawicki A, et al. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. *Bone* 2009; 45:1059-64.
9. Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int* 2011; 22:1659-67.
10. Fernández JM, Molinuevo MS, Sedlinsky C, Schurman L, Cortizo AM, McCarthy AD. Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel





- activation. *Eur J Pharmacol* 2013; 706:41-7.
11. Ammann P. Strontium ranelate: a physiological approach for an improved bone quality. *Bone* 2006; 38(2 Suppl 1):15-8.
  12. Reginster JY, Brandi ML, Cannata-Andía J, et al. The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2015; 26:1667-71.
  13. Guidelines on the handling and training of laboratory animals. In: The Biological Council of Animal Research and Welfare Panel. Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992.
  14. Tahara A, Matsuyama-Yokono A, Nakano R, Someya Y, Shibasaki M. Hypoglycaemic effects of anti-diabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103:560-8.
  15. Bain SD, Jerome C, Shen V, Dupin-Roger I, Ammann P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporos Int* 2009; 20:1417-28.
  16. Molinuevo MS, Schurman L, McCarthy AD, et al. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vitro and in vivo Studies. *J Bone Miner Res* 2010; 25:211-21.
  17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
  18. McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Cortizo AM. Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem* 1997; 170:43-51.
  19. Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol* 2006; 536:38-46.