

# Níveis séricos de vitamina B12 não se relacionam com baixa densidade mineral óssea em mulheres brasileiras na pós-menopausa

Adriana Maria Kakehasi<sup>1</sup>, Ariane Vieira Carvalho<sup>2</sup>, Fabiana Alves Nunes Maksud<sup>3</sup>, Alfredo José Afonso Barbosa<sup>4</sup>

## RESUMO

**Introdução:** Osteoporose e deficiência de vitamina B12 são condições de prevalência crescente com o envelhecimento. A associação entre níveis séricos de vitamina B12, baixa massa óssea e risco aumentado de fraturas ósseas tem sido descrita, mas os estudos não são homogêneos e os resultados são controversos. **Objetivo:** Investigar a associação entre níveis plasmáticos de vitamina B12 e densidade mineral óssea em mulheres assintomáticas na pós-menopausa. **Métodos:** Mulheres assintomáticas no período pós-menopausa foram consecutivamente incluídas neste estudo transversal. A densidade mineral óssea (coluna lombar e fêmur) foi avaliada pelo método DXA Lunar Prodigy Vision, e foram determinados níveis sanguíneos de vitamina B12, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina óssea e hormônio paratireoideiano. Os critérios da Organização Mundial de Saúde foram considerados para o diagnóstico de osteoporose. **Resultados:** Foram incluídas neste estudo 70 mulheres, com média de idade de  $62,5 \pm 7$  anos. Do total, 18 (25,7%) apresentaram densidade mineral óssea normal, 33 (47,1%) tinham osteopenia e 19 (27,1%) tinham osteoporose. Seis (8,6%) pacientes haviam apresentado fratura de punho, duas (2,8%) reportaram diagnóstico de fratura vertebral e apenas uma (1,4%) paciente havia sofrido fratura de quadril. Os níveis de vitamina B12 (média  $\pm$  DP; pg/mL) das mulheres com densidade mineral óssea normal, osteopenia e osteoporose foram  $590,2 \pm 364,3$ ,  $536,6 \pm 452,3$  e  $590,2 \pm 497,9$ , respectivamente ( $P = 0,881$ ). A análise de regressão múltipla mostrou que o índice de massa corporal e a fosfatase alcalina óssea foram preditores da densidade mineral óssea na coluna lombar. **Conclusão:** Os resultados indicam que níveis de vitamina B12 não se relacionam à densidade mineral óssea neste grupo de mulheres brasileiras na pós-menopausa.

**Palavras-chave:** osteoporose, vitamina B12, pós-menopausa, densidade óssea.

© 2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

## INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma osteopatia sistêmica caracterizada pela perda de massa óssea e de força e por deterioração da microarquitetura da estrutura esquelética.<sup>1</sup> Trata-se de uma doença disseminada, afetando 75 milhões de pessoas na Europa, Estados Unidos e Japão. O número de fraturas incidentes anuais nos Estados Unidos é superior a 2 milhões.<sup>2-4</sup> O conceito da doença envolve vários mecanismos patogênicos que,

junto a fatores que aumentam o risco de quedas, contribuem para um aumento nas fraturas por fragilidade. Em alguns estudos, um quadro de deficiência de vitamina B12, basicamente avaliada pelos níveis plasmáticos, foi associado à baixa densidade mineral óssea (DMO) e risco aumentado de fratura.<sup>5-8</sup> No entanto, os resultados até agora publicados, inclusive experimentos animais, são controversos.<sup>9-14</sup> Basicamente, a vitamina B12 é obtida da dieta, pelo consumo de produtos derivados de animais, podendo interferir no metabolismo

Recebido em 09/11/2011. Aprovado, após revisão, em 05/09/2012. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesse. Suporte Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Comitê de Ética: 479/04.

Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

1. Doutor; Professor-Associado, Departamento de Sistema Locomotor, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

2. Aluna do curso de Medicina; Pesquisadora, Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina, Faculdade de Medicina, UFMG

3. Mestre em Medicina; Professor-Assistente, Faculdade de Medicina, UFMG

4. Pós-doutorado; Professor Titular, Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina, Faculdade de Medicina, UFMG

Correspondência para: Adriana Maria Kakehasi. Departamento de Sistema Locomotor. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Alfredo Balena, 190/193. CEP: 30130-100. Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: amkakehasi@gmail.com

ósseo, com estimulação positiva dos osteoblastos.<sup>15</sup> Por outro lado, um aumento nos níveis circulatórios de homocisteína causado pela deficiência de vitamina B12 pode estar implicado no surgimento precoce da osteoporose, na baixa qualidade óssea e em risco aumentado de fratura.<sup>8,16-21</sup> Ainda não ficou claramente definido o real impacto da deficiência de vitamina B12 na saúde dos ossos e nos mecanismos associados a transtornos do metabolismo ósseo.

A identificação de indivíduos que podem beneficiar-se com uma triagem para osteoporose mais imediata e com a intervenção terapêutica pode diminuir a morbidade e a mortalidade associadas à osteoporose. Considerando que tanto a osteoporose como a deficiência de cobalamina podem passar despercebidas durante vários anos e que possivelmente suas consequências clínicas serão irreversíveis,<sup>22</sup> os esforços devem voltar-se para a detecção dos indivíduos com maior risco para baixa massa óssea e fraturas por osteoporose. Embora fatores de risco para osteoporose e fraturas – idade, uso de glicocorticoides e história familiar – tenham sido devidamente documentados em pacientes brasileiros, jamais foram estudados os níveis plasmáticos de vitamina B12 em relação à DMO nessa população.<sup>23-25</sup> Portanto, o objetivo da presente investigação foi estudar uma possível conexão entre níveis plasmáticos de vitamina B12 e DMO em um grupo assintomático de mulheres brasileiras na pós-menopausa.

## MÉTODOS

### Participantes

O presente estudo transversal foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mulheres saudáveis na pós-menopausa (pelo menos cinco anos de amenorreia natural) foram consecutivamente recrutadas daquelas examinadas pela primeira vez na Unidade de Gastroenterologia do Hospital Geral entre janeiro e dezembro de 2007. Para participar do estudo, todas as participantes deram consentimento informado por escrito. Os critérios de exclusão foram: uso de medicamentos sabidamente capazes de influenciar a mineralização óssea (glicocorticoides durante mais de três meses, medicamentos antiepilépticos, suplementação de cálcio, varfarina, terapia de reposição hormonal, vitamina D e bifosfonatos), história de neoplasia, *diabetes mellitus* ou uso de metformina, disfunção hepática ou renal, uso de tabaco ou hábito alcoólico (mais de três doses por dia), suplementação com folato ou vitamina B12 e consumo de uma dieta exclusivamente vegetariana. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso em quilogramas dividido pela altura em metros quadrados.

### Determinações plasmáticas

Foi coletada uma amostra de sangue de uma veia antecubital de cada mulher na manhã seguinte a um jejum noturno. A vitamina B12 sérica foi determinada em uma análise única, e sua concentração (pg/mL) foi medida com o uso de um imunoensaio de quimioluminescência comercializado (valores de referência 200–950 pg/mL, CV 7%). Os níveis séricos de cálcio foram medidos por um eletrodo seletivo para íon com correção automática do pH (valores de referência 1,17–1,32 mmol/L) fosfatase alcalina óssea (FAO) por ensaio de imunocaptura (valores de referência 11,6–43,4 U/L), fósforo por um método UV colorimétrico de rotina (valores de referência 2,5–4,8 mg/dL) e hormônio paratireoideiano (PTH) por imunoensaio de quimioluminescência (valores de referência 8–80 pg/mL).

### Densidade mineral óssea

As DMOs do quadril e da coluna vertebral lombar foram determinadas com DXA Lunar Prodigy Vision (Lunar Corp., Madison, WI). Os estudos DXA foram obtidos por procedimentos de rotina para escaneamento e análise de acordo com as instruções do fabricante. O controle de qualidade diário foi realizado mediante a medição de um fantasma Lunar. Por ocasião do estudo, as mensurações fantasmas demonstraram resultados estáveis. O coeficiente de variação foi 1%. O diagnóstico de osteoporose foi estabelecido de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), representado por um T-score abaixo de  $-2,5$  DP.<sup>26</sup>

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o Statistical Package for the Social Sciences for Windows, versão 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). Os dados estão informados como média  $\pm$  DP. Para as variáveis contínuas sem distribuição normal, os grupos foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. Consideramos que  $P < 0,05$  indica diferença significativa. Foi utilizada análise de regressão faseada para avaliar variáveis independentemente relacionadas à DMO, análise de regressão simples para expressar a relação entre uma variável independente e DMO, análise de variância de fator único ou análise de covariância para fazer comparações entre grupos, e coeficiente de correlação ranqueada de Spearman para determinar a potência da associação entre pares de parâmetros ósseos.

## RESULTADOS

Foram incluídas no estudo 70 mulheres na pós-menopausa, todas com menopausa fisiológica. Considerando a população

**Tabela 1**

Parâmetros demográficos e bioquímicos da população em estudo de 70 mulheres na pós-menopausa, de acordo com a classificação por densidade mineral óssea

	Normal (n = 18)	Osteopenia (n = 33)	Osteoporose (n = 19)	P
Idade (anos)	61,7 ± 6,5	63,2 ± 7,5	62,5 ± 6,9	0,748
IMC <sup>a</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	30,6 ± 4,9	26,3 ± 4,2	25,2 ± 3,8	0,001
Idade da menopausa (anos)	47,3 ± 4,2	49,2 ± 3,7	48,8 ± 4,9	0,308
Duração da menopausa (anos)	14,4 ± 6,1	14 ± 7,1	13,8 ± 7,9	0,908
DMO <sup>b</sup> da coluna vertebral lombar (g/cm <sup>2</sup> )	1,213 ± 0,109	1,003 ± 0,097	0,804 ± 0,057	< 0,001
DMO <sup>b</sup> do colo femoral (g/cm <sup>2</sup> )	1,026 ± 0,089	0,833 ± 0,081	0,765 ± 0,119	< 0,001
DMO <sup>b</sup> femoral total (g/cm <sup>2</sup> )	1,090 ± 0,106	0,880 ± 0,097	0,795 ± 0,117	< 0,001
Vitamina B12 (pg/mL)	590,2 ± 364,3	536,6 ± 452,3	590,2 ± 497,9	0,881
Cálcio sérico (mmol/L)	1,22 ± 0,06	1,24 ± 0,03	1,26 ± 0,06	0,026
Fósforo sérico (mg/dL)	3,8 ± 0,59	3,7 ± 0,59	3,6 ± 0,55	0,480
Fosfatase alcalina óssea sérica (U/L)	25,6 ± 8,8	26,7 ± 5,7	34,2 ± 12,6	0,006
PTH <sup>c</sup> sérico (pg/mL)	42,2 ± 12,0	45,9 ± 14,4	41,1 ± 16,7	0,463

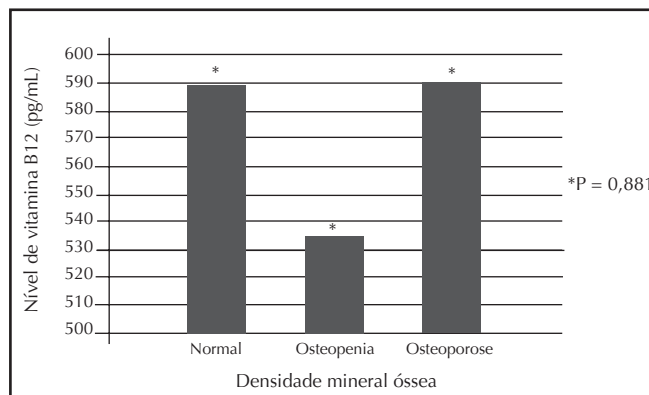
Valores expressados em média ± DP. <sup>a</sup>: índice de massa corporal; <sup>b</sup>: densidade mineral óssea.

total do estudo, a média de idade na primeira consulta foi 62,5 ± 6,9 anos (variação: 50–79), IMC médio de 27,1 ± 4,7 kg/m<sup>2</sup> (variação: 17,9–43), DMO média de 0,913 ± 0,153 g/cm<sup>2</sup> (variação: 0,533–1,317) para o fêmur total, 0,864 ± 0,137 g/cm<sup>2</sup> (variação: 0,564–1,234) para o colo femoral e 1,003 ± 0,175 g/cm<sup>2</sup> (variação: 0,670–1,414) para a coluna vertebral lombar. A média geométrica dos níveis plasmáticos de vitamina B12 foi 565 ± 439 pg/mL (variação: 156–2261). Seis (8,6%) pacientes haviam sofrido fratura de pulso e dois (2,8%) informaram pelo menos uma fratura vertebral. Um (1,4%) paciente havia sofrido uma fratura do quadril.

Na avaliação por DXA, considerou-se que 19 (27,1%) mulheres apresentavam osteoporose (T-score abaixo de -2,5), 33 (47,1%) apresentavam osteopenia (T-score entre -2,5 e -1), e 18 (25,7%) apresentavam valores normais para DMO. Os parâmetros demográficos e bioquímicos dos três subgrupos, de acordo com o diagnóstico densitométrico, estão resumidos na Tabela 1. A média ± DP para os níveis de vitamina B12 (pg/mL) de mulheres com DMO normal, osteopenia e osteoporose foram 590,2 ± 364,3, 536,6 ± 452,3 e 590,2 ± 497,9, respectivamente (P = 0,881) (Figura 1). A análise de regressão múltipla demonstrou que IMC e FAO foram os principais preditores de DMO da coluna vertebral lombar (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

A osteoporose é um transtorno esquelético caracterizado por comprometimento da resistência óssea, predispondo o



**Figura 1**  
Níveis de vitamina B12 de acordo com a Organização Mundial da Saúde para densidade mineral óssea.

**Tabela 2**

Correlação entre os resultados de DXA e variáveis relacionadas ao osso

Pares de variáveis	r <sup>a</sup>	P
DMO <sup>b</sup> e IMC <sup>c</sup>	0,287	0,002
DMO e cálcio	-0,16	0,11
DMO e fósforo	0,03	0,78
DMO e PTH <sup>d</sup>	0,01	0,94
DMO e fosfatase alcalina óssea	0,34	0,001
DMO e idade	-0,091	0,34
DMO e vitamina B12	0,009	0,93

<sup>a</sup>: coeficiente de Spearman; <sup>b</sup>: densidade mineral óssea; <sup>c</sup>: índice de massa corporal; <sup>d</sup>: hormônio paratireoideano.

indivíduo a maior risco de fraturas, especialmente de quadril, pulso e coluna vertebral. A deficiência de estrogênio na pós-menopausa aumenta a taxa de remodelagem óssea e a quantidade de osso perdido a cada ciclo de remodelagem.<sup>27</sup> Além disso, muitos fatores de risco estão associados a fraturas de osteoporose, inclusive baixa massa óssea de pico, fatores hormonais, doenças crônicas, uso de drogas, tabagismo, pouca atividade física, baixa ingestão de cálcio e vitamina D, baixa estatura e história pessoal ou familiar de fratura.

A deficiência de vitamina B12 também foi relacionada a baixa massa óssea e a maior risco de fratura, mas os resultados são controversos (Tabela 3). Tucker *et al.*<sup>6</sup> demonstraram uma relação entre baixa massa óssea no quadril e na coluna vertebral lombar e baixos níveis de vitamina B12. O mesmo achado foi observado em estudos de Cagnacci *et al.*<sup>12,13</sup> e Gjestal *et al.*<sup>28</sup> Do mesmo modo, Rejnmark *et al.*<sup>11</sup> demonstraram haver associação significativa entre ingestão de folato (mas não de vitamina

B12) e massa óssea. Um estudo de Dhonukshe-Rutten *et al.*<sup>5</sup> alertou para o fato de que a vitamina B12 estava associada à baixa DMO em mulheres, mas não em homens.

A deficiência de vitamina B12, comum entre os idosos, pode levar a complicações neurológicas caracterizadas por parestesia, perda da propriocepção e redução do sentido de vibração nos membros inferiores, condições que podem aumentar a propensão para quedas.<sup>29,30</sup> Estudos epidemiológicos na população geral demonstraram prevalência de deficiência de vitamina B12 de aproximadamente 20% (entre 5% e 60%), dependendo da definição de deficiência de cobalamina.

A cobalamina é cofator importante no metabolismo dos aminoácidos, e sua deficiência pode ser responsável pelo aumento nos níveis de homocisteína, que também estão ligados à osteoporose e às fraturas ósseas.<sup>14,16,17</sup> Aparentemente a homocisteína interfere com as interligações do colágeno recém-formado e estimula a formação e a atividade dos osteoblastos.

**Tabela 3**

Resumo dos estudos que analisaram os níveis séricos de vitamina B12, risco de fratura e densidade mineral óssea

Autor	Participantes	DMO	Risco de fratura	Comentários
Dhonukshe-Rutten RA <i>et al.</i> <sup>5</sup>	194, homens e mulheres	+	ND	
Cagnacci A <i>et al.</i> <sup>12</sup>	161, mulheres na pós-menopausa	-	ND	
Macdonald HM <i>et al.</i> <sup>40</sup>	1.241, mulheres, 45-54 anos	-	ND	
Stone KL <i>et al.</i> <sup>41</sup>	83, mulheres na pós-menopausa, >65 anos	-	ND	
Tucker KL <i>et al.</i> <sup>6</sup>	2.456, homens e mulheres	+	ND	
Ravaglia P <i>et al.</i> <sup>42</sup>	702, homens e mulheres	ND	-	Risco de fratura associado a níveis de folato
Morris MS <i>et al.</i> <sup>43</sup>	1.550, homens e mulheres	+	ND	
Dhonukshe-Rutten RA <i>et al.</i> <sup>14</sup>	1.267, homens e mulheres	+	+	DMO por BUA
Sato Y <i>et al.</i> <sup>44</sup>	433, pacientes de AVC hemiplégicos	-	+	
Gjesdal CG <i>et al.</i> <sup>28</sup>	5.338, homens e mulheres	-	ND	DMO associada a níveis de homocisteína
Gjesdal CG <i>et al.</i> <sup>45</sup>	4.766, homens e mulheres	ND	-	
Baines M <i>et al.</i> <sup>46</sup>	328, mulheres na pós-menopausa	-	ND	DMO associada a níveis de folato
Gerdhem P <i>et al.</i> <sup>5</sup>	996, mulheres >75 anos	ND	-	Sem associação com níveis de folato
McLean RR <sup>7</sup>	1.002, homens e mulheres	+	+	
Cagnacci A <i>et al.</i> <sup>13</sup>	117, mulheres na pós-menopausa	-	ND	Cinco anos de acompanhamento, mudança na DMO associada a níveis de folato
Ouzzif Z <i>et al.</i> <sup>18</sup>	188, mulheres na pós-menopausa	+	ND	Associação com DMO do quadril, mas não da coluna vertebral lombar
<b>Presente estudo, 2012</b>	70, mulheres na pós-menopausa	-	ND	

+: relação significativa; -: sem relação; DMO: densidade mineral óssea; BUA: atenuação da onda sonora; ND: não disponível.

Mas a vitamina B12 pode influenciar o metabolismo ósseo por outras vias, além do metabolismo da homocisteína. Outro efeito possível poderia ser a ação direta da vitamina B12 nos osteoblastos, visto ter sido observada uma resposta funcional e proliferativa dose-dependente quando duas linhagens celulares de osteossarcoma foram estimuladas com cianocobalamina.<sup>15</sup>

Em concordância com nossos resultados, Cagnacci *et al.*,<sup>13</sup> em um estudo com 117 mulheres na pós-menopausa, não observaram relação significativa entre a mudança na DMO vertebral e vitamina B12; mas a taxa anual de mudança na DMO vertebral estava independentemente relacionada aos níveis de folato. Não foi observada relação com homocisteína. Um estudo transversal de Rejnmark *et al.*<sup>11</sup> demonstrou correlações positivas entre o consumo diário proveniente da dieta e o consumo da dieta acrescido de suplementos de folato e DMO no colo femoral; mas também, nesse caso, sem relação entre DMO e vitamina B6 ou B12 em mulheres na pós-menopausa. Um estudo seccional relatou os valores médios da análise nutricional de registros alimentares com homocisteína e cobalamina sérica livre em mulheres brasileiras adultas, não tendo demonstrado ingestão deficiente.<sup>31</sup>

A redução da acidez gástrica, resultante do envelhecimento ou da gastrite atrófica (que pode ocorrer por um mecanismo autoimune, ou como estágio avançado da infecção por *H. pylori*), pode estar implicada em indivíduos com comprometimento do quadro da vitamina B12.<sup>32</sup> Estima-se que a hipocloridria afete até 40% dos idosos, estando associada ao comprometimento da absorção de vitamina B12 ligada à proteína. Embora um estudo retrospectivo em mulheres tenha observado taxas mais elevadas de fratura entre aquelas com anemia perniciosa, em comparação com controles normais,<sup>33</sup> não pudemos detectar qualquer diferença na DMO entre pacientes com gastrite autoimune, gastrite por *H. pylori* e controles normais.<sup>34</sup> Também é possível que o uso aumentado de bloqueadores ácidos possa contribuir para a ocorrência de deficiência de vitamina B12.<sup>35</sup>

Apesar do cálcio sérico mais alto no grupo de osteoporose, a análise estatística entre cálcio e outros parâmetros não demonstrou diferença significativa, podendo ser explicado pela atividade osteoclástica nesse grupo, visto que nenhuma paciente apresentou níveis acima do limite superior normal nem outras condições patológicas hipercalcêmicas.

Nosso estudo tem limitações, pois o tamanho da amostra não permite a generalização dos resultados; mas até onde vai nosso conhecimento, essa é a primeira investigação da relação entre o quadro de vitamina B12 e DMO em mulheres brasileiras na pós-menopausa. Embora as participantes tenham sido recrutadas da comunidade, observamos critérios de exclusão como doenças e situações que pudessem influenciar a saúde

óssea. Isso faz com que os resultados sejam menos passíveis de generalização, mas pode dar base à ausência de associação entre níveis de vitamina B12 e DMO, pois os estudos que investigaram vitamina B12, DMO e risco de fratura não são homogêneos.<sup>8</sup> Também não medimos os níveis de ácido metilmalônico ou de homocisteína para confirmar a deficiência funcional de vitamina B12 e, por ter sido um estudo observacional, as participantes não foram selecionadas com base na evidência de deficiência de vitamina B12. Não fizemos determinações dos níveis de vitamina D em nossa população em estudo. Embora importante, podem ocorrer diferenças étnicas nos efeitos do baixo quadro de vitamina D na massa óssea ou no metabolismo ósseo.<sup>36,37</sup> Caracteristicamente, os afro-americanos têm níveis de vitamina D mais baixos que os americanos caucasianos; contudo, têm prevalência mais baixa de osteoporose.<sup>38</sup> Um estudo transversal brasileiro em mulheres na pós-menopausa avaliou a correlação entre deficiência de vitamina D e DMO. Embora tenha sido observada elevada incidência de concentrações séricas inadequadas de 25-OH vitamina D (68,3%), com presença de 8% com hiperparatireoidismo secundário, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações séricas de vitamina D e DMO.<sup>39</sup>

Considerando que o risco de fraturas por osteoporose é mais alto em mulheres que em homens, todas as mulheres na pós-menopausa com mais de 65 anos devem ser examinadas para osteoporose. Mulheres na pós-menopausa mais jovens com fraturas ou fatores de risco devem passar por uma avaliação densitométrica e laboratorial para osteoporose. Isso reforça a importância da identificação dos fatores de risco em diferentes populações, com implicações diretas para o sistema de saúde pública. Nossos resultados indicam que os níveis séricos de vitamina B12 não parecem ser fator indicativo para triagem de baixa DMO em determinada população de mulheres na pós-menopausa. Portanto, os resultados até agora disponíveis sugerem que um baixo nível de vitamina B12 não é fator de risco confiável para osteoporose em mulheres brasileiras na pós-menopausa.

## REFERENCES

### REFERÊNCIAS

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001; 285(6):785–95.
2. Holrovd C, Cooper C, Dennison E. Epidemiology of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22(5):671–85.
3. Consensus Development Statement. Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? *Osteoporos Int* 1997; 7(1):1–6.
4. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359(9319):1761–7.

5. Dhonukshe-Rutten RA, Lips M, de Jong N, Chin AP, Hiddink GJ, van Dusseldorp M *et al.* Vitamin B-12 status is associated with bone mineral content and bone mineral density in frail elderly women but not in men. *J Nutr* 2003; 133(3):801–7.
6. Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA *et al.* Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2005; 20(1):152–8.
7. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Fredman L, Tucker KL, Samelson EJ *et al.* Plasma B vitamins, homocysteine, and their relation with bone loss and hip fracture in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(6):2206–12.
8. Herrmann M, Peter Schmidt J, Umanskaya N, Wagner A, Taban-Shomal O, Widmann T *et al.* The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B(6) and B(12) deficiencies in osteoporosis: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:1621–32.
9. Holstein JH, Herrmann M, Splett C, Herrmann W, Garcia P, Histing T *et al.* Low serum folate and vitamin B-6 are associated with an altered cancellous bone structure in humans. *Am J Clin Nutr* 2009; 90(5):1440–5.
10. Holstein JH, Herrmann M, Schmalenbach J, Obeid R, Olkū I, Klein M *et al.* Deficiencies of folate and vitamin B12 do not affect fracture healing in mice. *Bone* 2010; 47(1):151–5.
11. Rejnmark L, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Eiken P, Mosekilde L. Dietary intake of folate, but not vitamin B2 or B12, is associated with increased bone mineral density 5 anos after the menopause: results from a 10-year follow-up study in early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2008; 82(1):1–11.
12. Cagnacci A, Baldassari F, Rivolta G, Arangino S, Volpe A. Relation of homocysteine, folate, and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. *Bone* 2003; 33(6):956–9.
13. Cagnacci A, Bagni B, Zini A, Cannoletta M, Generali M, Volpe A. Relation of folates, vitamin B12 and homocysteine to vertebral bone mineral density change in postmenopausal women. A five-year longitudinal evaluation. *Bone* 2008; 42(2):314–20.
14. Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 2005; 20(6):921–9.
15. Kim GS, Kim CH, Park JY, Lee KU, Park CS. Effects of vitamin B12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR106 osteoblastic cells. *Metabolism* 1996; 45(12):1443–6.
16. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J *et al.* Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004; 350:2033–41.
17. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE *et al.* Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004; 350(20):2042–9.
18. Ouzzif Z, Oumghar K, Sbai K, Mounach A, Derouiche EL, El Maghraoui A. Relation of plasma total homocysteine, folate and vitamin B12 levels to bone mineral density in Moroccan healthy postmenopausal women. *Rheumatol Int.* 2010. Available from: <http://www.springerlink.com/content/v688202265287k18/fulltext.pdf> [Accessed on 8<sup>th</sup> Nov; 2011].
19. Bucciarelli P, Martini G, Martinelli I, Ceccarelli E, Gennari L, Bader R *et al.* The relationship between plasma homocysteine levels and bone mineral density in post-menopausal women. *Eur J Int Med* 2010; 21(4):301–5.
20. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE *et al.* Plasma homocysteine concentrations predict the risk of hip fracture in elderly men and women: the Framingham Study. *N Engl J Med* 2004; 350(20):2042–9.
21. Herrmann M, Wildemann B, Claes L, Klohs S, Ohnmacht M, Taban-Shomal O *et al.* Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. *Clin Chem* 2007; 53(8):1455–61.
22. Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE *et al.* Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in the elderly patients. *CMAJ* 2004; 171(3):251–9.
23. Parisi Jr PD, Chahade WH. Fatores de risco associados à osteoporose em uma população de mulheres brasileiras residentes em São José do Rio Pardo, estado de São Paulo. *Rev Bras Reumatol* 2007; 47(1):16–24.
24. Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporos Int* 2009; 20(3):399–408.
25. Nahas EA, Kawakami MS, Nahas-Neto J, Buttros DD, Cangussu L, Rodrigues AB. Assessment of risk factors for low bone mineral density in Brazilian postmenopausal women. *Climacteric* 2011; 14(2):220–7.
26. Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, Cooper C, Torgerson D. Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. *Osteoporos Int* 1997; 7(4):390–406.
27. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998; 13(5):763–73.
28. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, Refsum H, Drevon CA, Gjessing HK *et al.* Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Intern Med* 2006; 166(1):88–94.
29. Clarke R. Prevention of vitamin B-12 deficiency in old age. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2):151–2.
30. Toh BH, Van Driel IR, Glesson PA. Pernicious anemia. *N Engl J Med* 1997; 337(20):1441–8.
31. Colares-Bento F, Silveira S, Paula R, Córdova C, Silva A, Nóbrega O. Intake analysis of hematopoietic micronutrients and anemia: prevalence in Brazilian female older-adults. *Acta Med Port* 2009; 22(5):553–8.
32. Russell RM. Changes in gastrointestinal function attributed to aging. *Am J Clin Nutr* 1992; 55(6 Suppl):1203S–1207S.
33. Goerss JB, Kim CH, Atkinson EJ, Eastell R, O’Fallon WM, Melton LJ 3rd. Risk of fractures in patients with pernicious anemia. *J Bone Miner Res* 1992; 7(5):573–9.
34. Takehasi AM, Rodrigues CB, Carvalho AV, Barbosa AJA. Chronic gastritis and bone mineral density in women. *Dig Dis Sci* 2009; 54(4):819–24.

35. Force RW, Meeker AD, Cady PS, Culbertson VL, Force WS, Kelley CM. Ambulatory care increased vitamin B12 requirement associated with chronic acid suppression therapy. *Ann Pharmacother* 2003; 37(4):490-3.
36. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med* 2004; 116(9):634-9.
37. Garnero P, Munoz F, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Associations of vitamin D status with bone mineral density, bone turnover, bone loss and fracture risk in healthy postmenopausal women. The OFELY study. *Bone* 2007; 40(3):716-22.
38. Harris SS. Vitamin D and African Americans. *J Nutr* 2006; 136(4):1126-29.
39. Russo LAT, Gregório LH, Lacativa PGS, Marinheiro LPF. Concentration of 25-hydroxyvitamin D in postmenopausal women with low bone mineral density. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009; 53(9):1079-87.
40. Macdonald HM, McGuigan FE, Fraser WD, New SA, Ralston SH, Reid DM. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism interacts with riboflavin intake to influence bone mineral density. *Bone* 2004; 35(4):957-64.
41. Stone KL, Bauer DC, Sellmeyer D, Cummings ST. Low serum vitamin B-12 levels are associated with increased hip bone loss in older women: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(3):1217-21.
42. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Servadei L, Martelli M, Brunetti N *et al.* Folate, but not homocysteine, predicts the risk of fracture in elderly persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60(11):1458-62.
43. Morris MS, Jacques PF, Selhub J. Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone* 2005; 37(2):234-4.
44. Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in stroke patients. *Bone* 2005; 36(4):721-6.
45. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, Refsum H, Meyer HE, Tell GS. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 and the risk of hip fracture: the hordaland homocysteine study. *J Bone Miner Res* 2007; 22(5):747-56.
46. Baines M, Kredan MB, Usher J, Davison A, Higgins G, Taylor W *et al.* The association of homocysteine and its determinants MTHFR genotype, folate, vitamin B12 and vitamin B6 with bone mineral density in postmenopausal British women. *Bone* 2007; 40(3):730-6.
47. Gerdhem P, Ivaska KK, Isaksson A, Pettersson K, Väänänen HK, Obrant KJ *et al.* Associations between homocysteine, bone turnover, BMD, mortality, and fracture risk in elderly women. *J Bone Miner Res* 2007; 22(1):127-34.