

Efecto del tratamiento con ácido zoledrónico e hidroxocobalamina sobre la microarquitectura ósea en ratones con periodontitis y osteoporosis inducida: Estudio preclínico

Effect of zoledronic acid and hydroxocobalamin treatment on bone microarchitecture in mice with induced periodontitis and osteoporosis: preclinical study

Resumen

Objetivo. Evaluar el efecto del tratamiento con ácido zoledrónico e hidroxocobalamina sobre la microarquitectura ósea alveolar en ratones con periodontitis y osteoporosis inducidas. **Métodos.** Diseño experimental en fase preclínica. Se incluyeron 16 ratones hembras a quienes se les indujo osteoporosis mediante la ovariectomía total y también se indujo la periodontitis por inflamación por ligadura de seda negra 5/0 en el segundo molar maxilar, todos los protocolos fueron sometidos durante anestesia general. Los ratones se distribuyeron en 4 grupos: control, tratamiento con ácido zoledrónico, tratamiento con hidroxocobalamina y tratamiento combinado. A las 16 semanas, se realizó la autanasa, se realizó la disección para la evaluación mediante microtomografía; determinando la densidad mineral ósea (BMD), el volumen de hueso (BV/TV), espesor trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), separación trabecular (Tb.Sp); se realizó el análisis descriptivo y bivariado mediante ANOVA de 1 vía considerando un 95% de nivel de confianza. **Resultados.** El grupo que recibió tratamiento combinado de ácido zoledrónico e hidroxocobalamina presentó mayor densidad mineral ósea (DMO), mayor volumen óseo (BV/TV) y menor separación trabecular (Tb.Sp) en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$). **Conclusiones.** El tratamiento combinado de ácido zoledrónico e hidroxocobalamina mejora las características microarquitectónicas óseas en ratones con osteoporosis y periodontitis inducidas.

Palabras clave: Osteoporosis; Periodontitis; Pérdida de hueso alveolar; Ácido Zoledrónico; Hidroxocobalamina (fuente: DeCS BIREME).

Abstract

Objective. Evaluate the effect of zoledronic acid and hydroxocobalamin treatment on alveolar bone microarchitecture in mice with induced periodontitis and osteoporosis. **Methods.** Experimental design in preclinical phase. Sixteen female mice were included in which osteoporosis was induced by total ovariectomy and periodontitis was also induced by inflammation by 5/0 black silk ligation of the maxillary second molar, all

Marieta Petkova-Gueorguieva¹, César I. Franco-Quino¹, Victor M. Chumpitaz-Cerrate¹, Lesly K. Chavez-Rimache¹, Eliberto Ruiz-Ramirez¹, Vladimir E. Borda-Mendoza¹, Claudia A. Gonzales-Camacho¹, Angie S. Aponte-Laban¹

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Grupo "Investigación en Ciencias Básicas Estomatológicas (ICBEST)", Lima, Perú

Correspondencia:

César Franco-Quino: cfrancoq@unmsm.edu.pe
Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Av. Germán Amezaga N° 375 – Ciudad Universitaria. Cercado de Lima, Lima-Perú.
ORCID: 0000-0003-1773-3019

Coautores:

Marieta Petkova-Gueorguieva: mpetkovag@unmsm.edu.pe
ORCID: 0000-0001-6717-6957
César I. Franco-Quino: cfrancoq@unmsm.edu.pe
ORCID: 0000-0003-1773-3019
Victor M. Chumpitaz-Cerrate: vchumpitazc@unmsm.edu.pe
ORCID: 0000-0001-7073-8076
Lesly K. Chavez-Rimache: 11050007@unmsm.edu.pe
ORCID: 0000-0001-9987-7475
Eliberto Ruiz-Ramirez: eliberto.ruiz@unmsm.edu.pe
ORCID: 0000-0002-5340-7168
Vladimir E. Borda-Mendoza: elmer.borda@unmsm.edu.pe
ORCID: 0000-0001-6436-1436
Claudia A. Gonzales-Camacho: claudia.gonzales2@unmsm.edu.pe
ORCID: 0000-0002-0141-9263
Angie S. Aponte-Laban: angie.aponte@unmsm.edu.pe
ORCID: 0000-0002-8519-5200

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Fuente de financiamiento: Proyecto financiado por el VRIP-UNMSM (Código: A19051181)

Recibido: 09/07/2023

Aceptado: 11/12/2023

Publicado: 30/12/2023

protocols were performed under general anesthesia. The mice were distributed into 4 groups: control, treatment with zoledronic acid, treatment with hydroxocobalamin and combined treatment. At 16 weeks, euthanasia was performed, dissection was performed for evaluation by microtomography; determining bone mineral density (BMD), bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), number of trabeculae (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp); descriptive and bivariate analysis was performed using 1-way ANOVA with a 95% confidence level. **Results.** The group that received combined treatment of zoledronic acid and hydroxocobalamin presented higher bone mineral density (BMD), higher bone volume (BV/TV) and lower trabecular separation (Tb.Sp) compared to the control group ($p < 0.05$). **Conclusions.** Combined treatment with zoledronic acid and hydroxocobalamin improves bone microarchitectural features in mice with induced osteoporosis and periodontitis.

Keywords: Osteoporosis; Periodontitis; Alveolar Bone Loss; Zoledronic Acid; Hydroxocobalamin. (source: MeSH NLM).

Introducción

La osteoporosis y periodontitis son enfermedades crónicas, siendo la osteoporosis una enfermedad que se caracteriza por presentar menor densidad ósea y deterioro arquitectónico con mayor riesgo a fracturas¹; del mismo modo, la periodontitis es definida como la pérdida de inserción clínica, pérdida de hueso alveolar y profundidad al sondaje (Academia Americana de Periodoncia)². Ambas enfermedades comparten factores de riesgo, siendo la deficiencia de estrógeno el factor que incrementa la actividad de los osteoclastos y con ello reducción en la densidad mineral ósea³.

Actualmente, existen estudios que indican la asociación entre ambas enfermedades; pero no se cuenta con un consenso sobre la direccionalidad; por lo que se han realizado diferentes estudios de investigación básica realizados en modelos animales y también estudios en investigación aplicada de naturaleza observacional (transversal, casos y control, cohortes), sin ser concluyentes³⁻⁷; sin embargo, poco se ha reportado con relación a los efectos del tratamiento periodontal sobre la osteoporosis o a los efectos de los antiresortivos sobre la salud oral^{8,9}.

Se sabe que los bifosfonatos suelen ser fármacos empleados en el tratamiento de la osteoporosis, inhiben la actividad de los osteoclastos e incrementan la densidad mineral ósea, e incluso, en modelos preclínicos de osteoporosis, se ha reportado que algunos agentes presentan efectos analgésicos^{10,11}. Estos efectos analgésicos pueden ser atribuidos a la capacidad de reducir la producción de sustancia P y neuropéptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) y citoquinas inflamatorias (TNF- α)¹², e incluso se le atribuye la reducción en la expresión de receptores nociceptivos como CGRP y TRPV1¹¹.

Asimismo, se ha reportado que las vitaminas del complejo B participan en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, así como moduladoras en la síntesis de algunos neurotransmisores, además se les atribuye posibles efectos analgésicos y antineurálgicos, esencialmente la vitamina B12 que promueve la regeneración de fibras nerviosas dañadas¹³. En el tratamiento periodontal, se ha observado que las vitaminas del complejo B mejora-

ron la cicatrización y los niveles de adherencia clínica¹⁴ y en la osteoporosis, la deficiencia de vitamina B12 está asociada con menor densidad mineral ósea y mayor riesgo de fracturas¹⁵.

Por lo tanto, la asociación entre la periodontitis y osteoporosis, pueden reducir la densidad mineral ósea; sin embargo se desconoce la influencia de la asociación de los antiresortivos con las vitaminas del complejo B sobre las características óseas; por ello, el presente estudio tiene como objetivo evaluar, el efecto del tratamiento con ácido zoledrónico e hidroxocobalamina sobre la microarquitectura del hueso alveolar en ratones con periodontitis y osteoporosis inducidas.

Materiales y métodos

Estudio experimental en fase preclínica; en total, participaron 16 ratones hembra de la Cepa C57BL/6 (8 semanas, peso 35 ± 5 g), ambientados a temperaturas de 22°C, se les brindó alimento y bebida a consumo libre, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (4 días). Inicialmente los ratones fueron ambientados durante 5 días, luego los ratones fueron anestesiados por vía IP (ketamina 100mg/kg+xilazina 10mg/kg). La inducción de periodontitis¹⁶ se realizó en el segundo molar superior izquierdo, utilizando seda negra 5/0 estéril, a nivel cervical y con el nudo hacia la región palatina (Figura 1); la inducción de osteoporosis³ se realizó mediante exéresis completa de los ovarios (Figura 2) inicialmente se depiló la región dorsal, se realizó una incisión de 10 mm, se expuso los ovarios, se realizó la exéresis en ambos lados (izquierda – derecha), finalmente se realizó la sutura por planos y se aplicó rifocina tópica (1 g/100 mL). Posterior al procedimiento quirúrgico, los ratones fueron observados hasta la recuperación del estado de conciencia y se les administró tramadol (50 mg/kg subcutáneo, dosis única), además se diluyó paracetamol en la bebida para su libre consumo durante 3 días (0.47 mg/mL). A las 48 horas posteriores a la cirugía, los ratones fueron distribuidos en 4 grupos: grupo I: placebo (n=4); grupo II (n=4): ácido zoledrónico (dosis única 0.06 mg/kg, vía SC); grupo III (n=4): hidroxocobalamina (4 dosis de 1.7 mg/kg repetido cada semana, vía IP); grupo IV (n=4): ácido zoledrónico (dosis única 0.06 mg/kg, vía



Figura 1. Inducción de periodontitis mediante ligadura de seda negra 5/0.

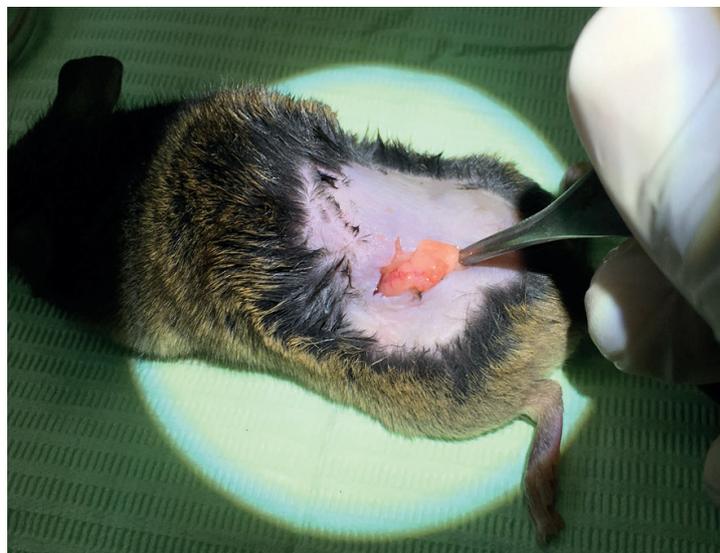


Figura 2. Inducción de osteoporosis mediante ovariectomía.

SC) + hidroxocobalamina (4 dosis de 1.7 mg/kg repetido cada semana, vía IP).

A las 16 semanas, los ratones fueron sometidos a eutanasia por sobredosis de ketamina (200 mg/kg) + xilazina (20 mg/kg) vía IP; luego se realizó la disección del maxilar para su posterior evaluación mediante el micro-CT.

La evaluación de la densidad mineral ósea se realizó con el microtomografo (Skyscan 1272, Bruker®, Bélgica), considerando un tamaño de 10um; las imágenes fueron reconstruidas utilizando el software Nrecom (Bruker®, Bélgica), y el análisis mediante el software CT Analyzer (Bruker®, Bélgica). Se tomó como referencia los bordes proximales del segundo molar, el límite amelocementario y 1 mm hacia el área apical. Se evaluó la densidad mineral ósea (BMD), el volumen de hueso (BV/TV), espesor trabecular (Tb.Th), número de trabéculas

(Tb.N), separación trabecular (Tb.Sp); las muestras fueron codificadas para reducir el sesgo durante la lectura.

Para el cuidado y manejo de animales de experimentación, todo procedimiento fue realizado por personal calificado en el cuidado, manejo de animales y experiencia en protocolos quirúrgicos, siguiendo las recomendaciones propuestas por el Instituto para la Investigación con Animales de Laboratorio (ILAR, 2010), además del cumplimiento del principio de las 3Rs: refinamiento, reducción y reemplazo; recomendaciones que se ajustan a la normativa vigente de la Ley de Protección de los animales (Ley N1 27265).

Se realizó el análisis descriptivo y bivariado mediante ANOVA de 1 vía luego del cumplimiento de supuestos, considerando un nivel de confianza del 95% empleando el software estadístico de STATA (v17).

Resultados

En la tabla 1 se observa incremento de la densidad mineral ósea (BMD) y el volumen óseo (BV/TV), observándose mejores resultados en el grupo que recibió el tratamiento combinado entre el ácido zoledrónico y la vitamina B 12 comparado con el grupo placebo. Del mismo modo, en la tabla 2 se observa incremento en el espesor trabecular (Tb.Th) y el número de trabéculas (Tb.N) sin diferencias significativas entre los grupos ($p>0.05$); sin embargo, al evaluar la separación trabecular (Tb.Sp), se observa que el grupo de la terapia combinada con ácido zoledrónico y vitamina B 12 presentó valores reducidos al compararlo con el grupo placebo ($p<0.05$).

Discusión

En el presente estudio los ratones desarrollaron osteoporosis inducida por ovariectomía y periodontitis inducida por inflamación, así mismo existe una tendencia en la que se observó que la microarquitectura del hueso alveolar fue superior en el grupo que recibió la terapia combinada de ácido zoledrónico y vitamina B12 en comparación con el grupo control. Al respecto, no se cuenta con suficiente evidencia sobre la interacción entre ambos fármacos. Estudios *in vitro* realizados por Fiuza *et al.*¹⁷ indican que el risedronato, cobalamina y la asociación de ambas, no altera la proliferación celular, ni interfiere con la formación de nódulos minerales en un cultivo de osteoblastos.

Tabla 1. Evaluación microtomográfica de la arquitectura ósea en hueso alveolar.

	Grupos	n	Media	DE	IC 95%		p*
					Inferior	Superior	
BMD (g/cm ³)	Placebo	4	0,46	0,06	0,36	0,56	0,02
	Ácido zoledrónico	4	0,60	0,19	0,30	0,90	
	Vit. B12	4	0,75 [†]	0,09	0,61	0,90	
	Ácido zoledrónico + Vit. B 12	4	0,76 [†]	0,14	0,54	0,98	
BV/TV (%)	Placebo	4	35,70	4,86	27,97	43,44	0,02
	Ácido zoledrónico	4	46,28	13,63	24,59	67,98	
	Vit. B12	4	57,48 [†]	7,16	46,09	68,86	
	Ácido zoledrónico + Vit. B 12	4	57,90 [†]	10,50	41,18	74,61	

BMD: Densidad mineral ósea, BV/TV: Volumen óseo. *: Anova de 1 vía ($p<0,05$) †: Comparación de Bonferroni ($p<0.05$) con relación al grupo placebo

Tabla 2. Evaluación microtomográfica del trabeculado óseo en hueso alveolar.

	Grupos	n	Media	DE	IC 95%		p*
					Inferior	Superior	
Tb.Th (mm)	Placebo	4	0,09	0,02	0,06	0,12	0,115
	Ácido zoledrónico	4	0,10	0,03	0,06	0,14	
	Vit. B12	4	0,11	0,00	0,11	0,12	
	Ácido zoledrónico + Vit. B 12	4	0,12	0,01	0,11	0,13	
Tb.N (1/mm)	Placebo	4	4,02	0,63	3,02	5,03	0,154
	Ácido zoledrónico	4	4,57	0,50	3,78	5,36	
	Vit. B12	4	5,13	0,81	3,85	6,42	
	Ácido zoledrónico + Vit. B 12	4	4,72	0,56	3,83	5,61	
Tb.Sp (mm)	Placebo	4	0,14	0,01	0,13	0,15	0,016
	Ácido zoledrónico	4	0,12	0,04	0,06	0,17	
	Vit. B12	4	0,07 [†]	0,02	0,05	0,10	
	Ácido zoledrónico + Vit. B 12	4	0,08 [†]	0,02	0,04	0,12	

Tb.Th: Espesor trabecular, Tb.N: Número de trabéculas, Tb.Sp: Separación trabecular. *: Anova de 1 vía ($p<0,05$). †: Comparación de Bonferroni ($p<0.05$) con relación al grupo placebo

Se reconoce que la periodontitis y la osteoporosis son enfermedades crónicas que al presentarse de manera simultánea, promueven una mayor destrucción del hueso alveolar; en el primer caso, provocada por el incremento de los mediadores inflamatorios y la proliferación de bacterias periodontopatógenas; y en el caso de osteoporosis, principalmente por la deficiencia de estrógenos, provocando incremento de los osteoclastos y también incremento de la homocisteína¹⁸⁻²⁰. La homocisteína es un aminoácido producto del metabolismo de la metionina, útil como biomarcador de enfermedad cardiovascular y otras enfermedades degenerativas como el Alzheimer²¹; en cuanto a la hiperhomocisteinemia, se ha asociado con mayor riesgo de producir osteoporosis y fracturas óseas, provocando una mayor diferenciación de osteoclastos por incremento del RANKL y disminución de la osteoprotegerina²². Asimismo, la hiperhomocisteinemia reduce los niveles de fosfatasa alcalina esquelética y la osteocalcina²³, inhibe a los osteoblastos e incrementa las enzimas metaloproteinasas de la matriz (MMP), además reduce el flujo vascular óseo, reduciendo esencialmente la densidad mineral ósea²⁴.

Se debe considerar que uno de los tratamientos para la osteoporosis corresponde a los bifosfonatos, los cuales evitan el deterioro óseo, reduciendo el riesgo de fracturas y complicaciones como el dolor y limitaciones funcionales^{1,25}; este tratamiento se complementa con vitamina D y calcio, que mejoran la densidad mineral ósea^{26,27}; así mismo, esta terapia puede beneficiar a la preservación del hueso alveolar. Al respecto, Polizos *et al.*²⁸ evaluaron los niveles séricos de homocisteína, folato y vitamina B12, en pacientes con enfermedad ósea de Paget, observando que disminuyeron los valores de homocisteína luego de la administración de una dosis única de ácido zoledrónico.

Las vitaminas B12 y B9 son cofactores importantes en el metabolismo de la homocisteína, por lo que la administración de cianocobalamina podría mantener una adecuada densidad mineral ósea, además se ha reportado que incrementa la proliferación de osteoblastos²⁹. Además del efecto regulador en el tejido óseo, también se ha reportado el efecto analgésico de las vitaminas del complejo B (tiamina, piridoxina y cianocobalamina) facilitando la regeneración de las fibras nerviosas dañadas, estabilizando la excitabilidad nerviosa e interactuando inhibiendo el dolor¹³. Por otra parte, los resultados sobre el rol de la administración de vitamina B12 sobre la densidad mineral ósea son contradictorios³⁰⁻³³; además se cuenta con poca evidencia sobre el efecto de las altas dosis del complejo de vitaminas B (30). Asimismo, con relación a los beneficios logrados en lesiones orales, se ha reportado que la vitamina B12 facilita la cicatrización de las heridas y también mejora la salud periodontal^{14,34}, considerando que todas las variantes de la vitamina B12 (metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina) presentan muy buena biodisponibilidad y seguridad³⁵.

Por lo tanto, la administración conjunta del ácido zoledrónico asociado a hidroxocobalamina pueden generar

sinergismo en la preservación del hueso alveolar en condiciones de periodontitis y osteoporosis; sin embargo, de acuerdo al diseño de estudio y la muestra pequeña, estos resultados son exploratorios, por lo que se recomienda realizar más estudios considerando diferentes esquemas de dosificación y duración de la terapia. Además de la necesidad de realizar dosaje plasmático de biomarcadores óseos y endocrinos.

Conclusión

El tratamiento aplicado al grupo IV (Terapia combinada de ácido zoledrónico e hidroxocobalamina) mejora las características microarquitectónicas óseas en ratones con osteoporosis y periodontitis inducida.

Referencias bibliográficas

1. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. *The Lancet* 2019;393(10169):364-76. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32112-3
2. Botelho J, Machado M, Proença L, Mendes J. The 2018 periodontitis case definition improves accuracy performance of full-mouth partial diagnostic protocols. *Sci Rep*. 2020;10:7093. DOI: 10.1038/s41598-020-63700-6.
3. Anbinder AL, Moraes RM, Lima GMG, Oliveira FE, Campos DRC, Rossoni RD, et al. Periodontal disease exacerbates systemic ovariectomy-induced bone loss in mice. *Bone*. 2016;83:241-7. DOI: 10.1016/j.bone.2015.11.014.
4. Luo K, Ma S, Guo J, Huang Y, Yan F, Xiao Y. Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. *Biomed Res Int*. 2014;316134. DOI: 10.1155/2014/316134.
5. Chin-Wei Wang, McCauley LK. Osteoporosis and Periodontitis. *Curr Osteoporos Rep*. 2016;14(6):284. DOI: 10.1007/s11914-016-0330-3.
6. Navarrete M, Caro JC, Prato A, Secchi I. Asociación entre osteoporosis y periodontitis crónica. *Rev Clin Perio Implantol Rehabil Oral*. 2016;9(1):25-9. DOI: 10.1016/j.piro.2015.02.014.
7. Gomes-Filho IS, Passos J de S, Cruz SS, Vianna MIP, Cerqueira E de MM, Oliveira DC, et al. The Association between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *J Periodontol*. 2007;78(9):1731-40. DOI: 10.1902/jop.2007.070057.
8. Skoufou I, Yavropoulou M, Zafeiris C. Could treating periodontitis prevent osteoporosis? An update of the last decade. *J Res Pract the Musc Syst*. 2019;03(03):96-101. DOI: 10.22540/JRPMS-03-096.
9. Bhavsar N V., Trivedi SR, Dulani K, Brahmhatt N, Shah S, Chaudhri D. Clinical and radiographic evaluation of effect of risedronate 5 mg as an adjunct to treatment of chronic periodontitis in postmenopausal women (12-month study). *Osteop Int*. 2016;27(8):2611-9. DOI: 10.1007/s00198-016-3577-8.
10. Naito Y, Wakabayashi H, Kato S, Nakagawa T, Iino T, Sudo A. Alendronate inhibits hyperalgesia and suppresses neuropeptide markers of pain in a mouse model of osteoporosis. *J Orthop Sci*. 2017;22(4):771-7. DOI: 10.1016/j.jos.2017.02.001.

11. Nakagawa T, Wakabayashi H, Naito Y, Kato S, Miyamura G, Iino T, et al. The effects of bisphosphonate on pain-related behavior and immunohistochemical analyses in hindlimb-unloaded mice. *J Orthopaed Sci.* 2018;23(6):1063-9. DOI: 10.1016/j.jos.2018.06.002
12. Paolucci T, Saraceni VM, Piccinini G. Management of chronic pain in osteoporosis: challenges and solutions. *J Pain Res.* 2016;9:177-86. DOI: 10.2147/JPR.S83574.
13. Gazoni FM, Malezan WR, Santos FC. B complex vitamins for analgesic therapy. *Rev Dor. São Paulo.* 2016;17(1):52-6. DOI: 10.5935/1806-0013.20160013.
14. Neiva RF, Al-Shammari K, Nociti FH, Soehren S, Wang HL. Effects of Vitamin-B Complex Supplementation on Periodontal Wound Healing. *J Periodontol.* 2005;76(7):1084-91. DOI: 10.1902/jop.2005.76.7.1084.
15. Ebesunun MO, Umahoin KO, Alonge TO, Adebuseye LA. Plasma homocysteine, B vitamins and bone mineral density in osteoporosis: a possible risk for bone fracture. *Afr J Med Med Sci.* 2014;43(1):41-7.
16. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods.* 2013;394(1-2):49-54. DOI: 10.1016/j.jim.2013.05.002.
17. Fiuza JA, Martinez EF, Brito RB de. In vitro evaluation of the effects of risedronate associated with cobalamin on osteoblastic cells. *Rev Gaúcha Odontol.* 2015;63(2). DOI: 10.1590/1981-863720150002000042445.
18. Xu XC, Chen H, Zhang X, Zhai ZJ, Liu XQ, Zheng XY, et al. Effects of oestrogen deficiency on the alveolar bone of rats with experimental Periodontitis. *Mol Med Rep.* 2015;12(3):3494-502. DOI: 10.3892/mmr.2015.3875.
19. Dai J, Ma Y, Shi M, Cao Z, Zhang Y, Miron RJ. Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2016;20(3):581-8. DOI: 10.1007/s00784-015-1531-3.
20. Zhang Z yu, Xie M ru, Liu Y, Li Y xu, Wu K, Ding Y mei. Effect of periodontal pathogens on total bone volume fraction: A phenotypic study. *Current Med Sci.* 2020;40(4):753-60. DOI: 10.1007/s11596-020-2243-8.
21. Tinelli C, Di Pino A, Ficulle E, Marcelli S, Feligioni M. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. *Front Nutr.* 2019;6:49. DOI: 10.3389/fnut.2019.00049.
22. Ostrakhovitch EA, Tabibzadeh S. Homocysteine and age-associated disorders. *Ageing Res Rev.* 2019;49:144-64. DOI: 10.1016/j.arr.2018.10.010.
23. 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 Mineral Res.* 2004;20(1):152-8. DOI: 10.1359/JBMR.041018.
24. Vacek TP, Kalani A, Voor MJ, Tyagi SC, Tyagi N. The role of homocysteine in bone remodeling. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(3):579-90. DOI: 10.1515/cclm-2012-0605.
25. Compston J, Cooper A, Cooper C, Gittoes N, Gregson C, Harvey N, et al. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Arch Osteoporos.* 2017;12(1):43. DOI: 10.1007/s11657-017-0324-5.
26. Ayed MS, Alsharif AF, Divakar DD, Jhugroo C, Alosaimi B, Mustafa M. Evaluating the possible association between systemic osteoporosis and periodontal disease progression in postmenopausal women. *disease-a-month.* 2018; 65(6):193-215. DOI: 10.1016/j.disease-a-month.2018.11.001.
27. Penoni DC, Leão ATT, Fernandes TM, Torres SR. Possible links between osteoporosis and periodontal disease. *Rev Bras Reumatol (English Edition).* 2017;57(3):270-3. DOI: 10.1016/j.rbre.2016.03.004.
28. Polyzos SA, Anastasilakis AD, Efstathiadou Z, Litsas I, Kita M, Panagiotou A, et al. Serum homocysteine, folate and vitamin B12 in patients with Paget's disease of bone: the effect of zoledronic acid. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(3):314-9. DOI: 10.1007/s00774-009-0131-1.
29. Dai Z, Koh WP. B-vitamins and bone health—a review of the current evidence. *Nutrients.* 2015;7(5):3322-46. DOI: 10.3390/nu7053322.
30. Bozkurt N, Erdem M, Yilmaz E, Erdem A, Biri A, Kubatova A, et al. The relationship of homocysteine, B12 and folic acid with the bone mineral density of the femur and lumbar spine in Turkish postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;280(3):381-7. DOI: 10.1007/s00404-009-0936-0.
31. 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 Intern Med.* 2010;21(4):301-5. DOI: 10.1016/j.ejim.2010.03.017.
32. Clarke M, Ward M, Dickey W, Hoey L, Molloy AM, Waldron L, et al. B-vitamin status in relation to bone mineral density in treated celiac disease patients. *Scand J Gastroenterol.* 2015;50(8):975-84. DOI: 10.3109/00365521.2015.1015603.
33. Bahtiri E, Islami H, Rexhepi S, Qorraj-Bytyqi H, Thaçi K, Thaçi S, et al. Relationship of homocysteine levels with lumbar spine and femur neck BMD in postmenopausal women. *Acta Reumatol Port.* 40(4):355-62.
34. Zong G, Holtfreter B, Scott AE, Völzke H, Petersmann A, Dietrich T, et al. Serum vitamin B12 is inversely associated with periodontal progression and risk of tooth loss: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol.* 2016;43(1):2-9. DOI: 10.1111/jcpe.12483.
35. Paul C, Brady DM. Comparative Bioavailability and Utilization of Particular Forms of B12 Supplements with Potential to Mitigate B12-related Genetic Polymorphisms. *Integrative Medicine: A Clinician's J.* 2017;16(1):42.

Agradecimientos

Agradecimientos al Dr. Miguel Jimenez y a los estudiantes del laboratorio de Farmacología de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, México.

Contribuciones de los autores

Redacción – Borrador original: MPG, CFQ, VCC, LCR, ERR

Redacción – Revisión y edición: MPG, CFQ, VCC, LCR, ERR, VBM, CGC, AAL

Visualización: ERR, VBM, CGC, AAL

Supervisión: MPG, CFQ, VCC

Administración del proyecto: MPG, VCC

Adquisición de fondos: MPG, VCC