

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE VITÓRIA - EMESCAM

JAMILE MARTINS BERNARDES
PRISCILA PINTO BARROSO
RENATA XAVIER FRECHIANI DE CASTRO

**O IMPACTO DO USO DA METFORMINA NO METABOLISMO DA VITAMINA B12:
REVISÃO DE LITERATURA**

VITÓRIA
2015

JAMILE MARTINS BERNARDES
PRISCILA PINTO BARROSO
RENATA XAVIER FRECHIANI DE CASTRO

**O IMPACTO DO USO DA METFORMINA NO METABOLISMO DA VITAMINA B12:
REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória como requisito parcial para obtenção do grau de médico.

Orientador: Renato Lírio Morelato

VITÓRIA
2015

JAMILE MARTINS BERNARDES
PRISCILA PINTO BARROSO
RENATA XAVIER FRECHIANI DE CASTRO

**O IMPACTO DO USO DA METFORMINA NO METABOLISMO DA VITAMINA B12:
REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM, como requisito parcial para obtenção do grau de médico.

Aprovado em 26 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Renato Lírio Morelato
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de
Misericórdia de Vitória – EMESCAM
Orientador

Prof. Albermar Roberts Harrigan
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de
Misericórdia de Vitória – EMESCAM

Nereida Ferraz Vieira do Prado
Residente de Geriatria no Hospital da Santa Casa de Misericórdia
de Vitória – HSCMV

Jamile Martins Bernardes

Dedico aos meus pais José Gilberto Bernardes e Flávia Maria Martins Bernardes e à minha irmã Isabela.

Priscila Pinto Barroso

Dedico aos meus pais Délio da Silva Barroso e Maricéa Barbosa Pinto Barroso e à minha irmã Thereza Raquel.

Renata Xavier Frechiani de Castro

Dedico aos meus pais Rostan Frechiani de Castro e Jucileni Xavier Frechiani de Castro, às minhas irmãs Bruna e Maitê, ao Andre e aos meus cunhados George e Dalton.

AGRADECIMENTOS

A todos que tornaram este projeto uma realidade, e especialmente nosso orientador, Dr. Renato Morelato, sobretudo pela disponibilidade, paciência, apoio e conhecimento dividido conosco;

Aos pacientes, pelo aprendizado constante e por serem a motivação do nosso estudo;

À nossa instituição, EMESCAM, pela oportunidade e por todo o aprendizado durante esses seis anos;

Finalmente, aos nossos pais e familiares, pelo apoio, suporte e força.

RESUMO

A Metformina é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 em todo o mundo. Sua aplicação na prática clínica possibilitou uma melhora no prognóstico dos pacientes através da redução da resistência insulínica e da proteção contra complicações vasculares. A maioria dos efeitos colaterais da medicação são bem tolerados, surgindo ao início do uso e desaparecendo com sua interrupção. Outros efeitos colaterais, como a deficiência de vitamina B12, são insidiosos, assintomáticos, surgem com seu uso crônico e não são facilmente detectados. A vitamina B12 possui papel fundamental na síntese do DNA, hematopoiese e desenvolvimento neurológico, e sua deficiência é classicamente associada ao surgimento de alterações hematológicas e déficit neurológico. A prevalência da deficiência de vitamina B12 induzida pelo uso da Metformina vem aumentando significativamente. Embora alguns estudos tenham confirmado a relação entre o uso da Metformina e a deficiência da vitamina, não há um consenso na literatura. Este trabalho consiste em uma revisão de literatura para avaliar a associação entre o uso da Metformina e a deficiência de vitamina B12 em pacientes diabéticos tipo 2 na bibliografia recente. Concluiu-se que os fatores predisponentes para o desenvolvimento da deficiência são idade, tempo de uso da medicação e dose utilizada. Sendo assim, é necessária a monitorização dos valores de vitamina B12 em pacientes diabéticos tipo 2, especialmente os que fazem uso crônico da Metformina e em doses elevadas. Devido à publicação de poucos ensaios clínicos sobre o assunto, esquemas de rastreio e de suplementação ainda precisam ser formulados.

Palavras-Chave: Deficiência de vitamina B12; Metformina; Diabetes mellitus;

ABSTRACT

Metformin is one of the most widely used medications in the treatment of type 2 diabetes worldwide. Its application in clinical practice enabled an improvement in the prognosis of patients by reducing insulin resistance and protecting against vascular complications. Most side effects of this medication are well tolerated, starting in the beginning of its use and disappearing with its cessation. Other side effects, such as vitamin B12 deficiency, are insidious, asymptomatic, come with chronic use and are not easily detected. Vitamin B12 has a primary role in the synthesis of DNA, hematopoiesis and neurological development, and its deficiency is classically associated with the onset of haematological disorders and neurological deficit. The prevalence of metformin-induced vitamin B12 deficiency has increased significantly. Although some studies have confirmed the relationship between the use of metformin and this vitamin deficiency, there is no agreement in the literature. This paper consists of a bibliographic review to assess the association between the use of metformin and vitamin B12 deficiency in type 2 diabetic patients in recent literature. It was concluded that the major predisposing factors for the development of B12 deficiency are age of the patient, time of medication use and dose. Therefore the monitoring of vitamin B12 values in type 2 diabetic patients, especially those who use Metformin chronically and in high doses, is required. Due to the publication of few clinical trials on the subject, schemes of screening and supplementation are yet to be formulated.

Keywords: Vitamin B12 deficiency; metformin; Diabetes mellitus;

LISTA DE SIGLAS

AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ADA	American Diabetes Association
AMM	Ácido Metilmalônico
AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP
Cbl	Cobalamina
DM	Diabetes Mellitus
DM 1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EASD	European Association for the Study of Diabetes
FI	Fentolitos
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
Hcy	Homocisteína
IF	Fator Intrínseco gástrico
MM-CoA	Metilmalonil-CoA
RI	Receptor de Insulina
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
TC	Transcobalamina
TCII	Transcobalamina II

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
3 JUSTIFICATIVA	13
4 METODOLOGIA	14
5 METFORMINA	16
5.1 MECANISMO DE AÇÃO	17
5.2 APLICAÇÃO CLÍNICA.....	19
6 VITAMINA B12	21
6.1 METABOLISMO E FUNÇÃO NO ORGANISMO	21
6.3 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B12	22
7 METFORMINA E HIPOVITAMINOSE B12: CORRELAÇÕES NA LITERATURA	24
7.1 NEXO CAUSAL.....	24
7.2 VARIÁVEIS ASSOCIADAS	26
7.3 MECANISMO FISIOPATOLÓGICO	27
7.4 RASTREIO, DIAGNÓSTICO E QUADRO CLÍNICO	27
7.5 CONDUTA E SEGUIMENTO	29
8 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) vem se tornando cada vez mais prevalente na população, sendo associado a uma significativa morbimortalidade e a um aumento nos custos para a saúde pública.¹

A Metformina é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento do DM2 em todo o mundo. Pertence à classe das biguanidas e foi aprovada para uso pelo FDA em 1994. A aplicação da Metformina na prática clínica possibilitou uma melhora no prognóstico dos pacientes diabéticos por intermédio da redução da resistência insulínica e da proteção contra complicações vasculares, consideradas as principais causas de morte entre esses pacientes.² A maioria dos *guidelines* mundiais recomenda que o uso da Metformina, na ausência de contraindicações, deve ser iniciado no momento do diagnóstico do DM2, associado a mudanças no estilo de vida.³

A eficácia da Metformina é comprovada em pacientes cuja produção de insulina ainda está preservada. A supressão da produção hepática de glicose proporcionada por essa medicação resulta na redução da hiperglicemia. Além disso, há melhora no padrão de resistência insulínica, aumento do consumo periférico de glicose e redução da absorção de glicose no trato gastrointestinal.⁴

A maioria dos efeitos colaterais da medicação são bem tolerados, sendo de intensidade leve a moderada, incluindo usualmente sintomas gastrointestinais como distensão abdominal, flatulências e diarreia. Em geral, esses efeitos surgem ao início do uso da medicação e desaparecem logo após sua interrupção. Vale destacar que há outros efeitos colaterais, insidiosos e assintomáticos, a exemplo da deficiência de vitamina B12, que surgem com o uso crônico da Metformina e não são facilmente detectados caso não seja dada a devida atenção.³

A vitamina B12 é um micronutriente chave responsável pela metilação do DNA e possui diversos papéis metabólicos que abrangem do metabolismo lipídico à disfunção endotelial.⁵ A deficiência da vitamina B12 tem como consequência uma desregulação metabólica e acúmulo intracelular de ácido metilmalônico e de homocisteína, sendo esta substância considerada um fator independente de risco

cardiovascular, causadora de grandes efeitos tóxicos aos neurônios e ao endotélio vascular.⁶

A deficiência desta vitamina é classicamente associada ao surgimento de alterações hematológicas, como macrocitose (volume corpuscular médio maior que 100fl) e neutrófilos hipersegmentados, na presença ou não de anemia, e até pancitopenia. Também são comuns alterações como atrofia gástrica, estomatite e mucosite intestinal gerando má absorção de nutrientes.⁶

Além dos efeitos hematológicos e gastrointestinais, a deficiência de cobalamina pode trazer também consequências neurológicas decorrentes da degeneração na mielinização dos oligodendrócitos dos cordões lateral e posterior da medula espinhal, responsáveis pela propriocepção e sensação vibratória, que apresentam-se reduzidos principalmente em membros inferiores. As manifestações clínicas iniciais são ataxia e parestesia, que podem evoluir para fraqueza importante, espasticidade e eventualmente incontinência fecal e urinária. Com menor frequência, pode haver perda de memória, irritabilidade e demência.⁶

É importante ressaltar que os sintomas de neuropatia periférica dos pacientes diabéticos podem sobrepor-se aos sintomas gerados pela deficiência de vitamina B12. Consequentemente, a dúvida quanto à causa e ao manejo da neuropatia periférica pode contribuir para um dano neurológico mais grave.³

A progressão do dano neurológico causado pela deficiência de cobalamina pode ser interrompida com um diagnóstico precoce e suplementação. Caso contrário, há risco de danos neurológicos permanentes.^{3,6}

A prevalência da deficiência de vitamina B12 induzida pelo uso da Metformina vem aumentando significativamente em todo o mundo devido à ampla aplicação dessa medicação no tratamento do diabetes.³

Os mecanismos que levam a essa deficiência ainda não estão bem definidos, mas estudos levantam hipóteses relacionando a Metformina a alterações na motilidade do intestino delgado com consequente superpopulação bacteriana, danos à membrana ileal cálcio-dependente e redução dos níveis de fator intrínseco.⁷

Embora alguns estudos tenham confirmado a relação entre o uso da Metformina e a deficiência de vitamina B12, não há um consenso na literatura. Este trabalho consiste em uma revisão de literatura para avaliar a associação entre o uso da Metformina e a deficiência de vitamina B12 em pacientes diabéticos tipo 2.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é revisar as informações disponíveis referentes ao impacto do uso de Metformina no metabolismo da vitamina B12 através da literatura recente.

Para isto, organizamos a revisão bibliográfica conforme os seguintes objetivos específicos: (1) analisar a influência da Metformina no metabolismo da vitamina B12; (2) avaliar a influência do tempo de uso da Metformina nos níveis de vitamina B12 e (3) descrever os impactos provocados pela deficiência de vitamina B12 em pacientes diabéticos tipo 2.

Adicionalmente, procuramos também (4) discutir evidências sobre a necessidade de um *screening* clínico para identificar a presença de deficiência de vitamina B12 em pacientes diabéticos tipo 2 em uso de Metformina e (5) avaliar a forma de tratamento da deficiência de vitamina B12 em pacientes diabéticos tipo 2 preconizada pela literatura.

3 JUSTIFICATIVA

A Metformina é considerada terapia de primeira linha no tratamento do DM2, sendo amplamente utilizada na prática clínica.³ Estudos têm associado a deficiência de vitamina B12 como um dos principais efeitos colaterais do tratamento com Metformina⁸. A deficiência de vitamina B12 é manifestada principalmente através de alterações hematológicas e neurológicas, que podem gerar danos irreversíveis ao paciente⁵.

Mais estudos sobre esta associação são necessários, principalmente para orientações quanto ao rastreio e tratamento da deficiência de vitamina B12. Esta revisão visa reunir os trabalhos mais recentes e suas conclusões a respeito dessa associação.

4 METODOLOGIA

Foi realizada revisão bibliográfica dos artigos publicados a partir do ano de 2010 nas bases de dados Pubmed e Portal da CAPES. Foram utilizados, na busca, os descritores “Metformin” e “Vitamin B12” e incluídos na seleção os trabalhos realizados em humanos, artigos originais ou de revisão, publicados na língua inglesa em revistas científicas que possuem *qualis A* no intervalo de 2010 a janeiro de 2015.

No Portal Periódicos Capes, em Science Direct (Elsevier), conforme pesquisa obtida em 23 de janeiro de 2015, foram encontrados 493 artigos e, após a seleção inicial, restaram 16 artigos.

No banco de dados do Pubmed, conforme pesquisa obtida na mesma data, foram encontrados 71 artigos e, após a seleção inicial e exclusão das duplicatas de artigos já encontrados no Science Direct, restaram 10 artigos.

A pesquisa realizada na base LILACS na mesma data, com os mesmos filtros e termos de busca, encontrou apenas um artigo que, apesar de ser *qualis B*, é o único artigo brasileiro encontrado sobre o assunto, sendo, portanto utilizado na revisão.

Entre os trabalhos utilizados, apenas o artigo de Wulffelé et al²⁰ foi publicado há mais de 5 anos, em 2003, tendo sido utilizado por possuir a mesma amostra de outro publicado em 2010, de Jager et al³, e por ter sido localizado através deste.

A seleção final dos artigos foi feita pela avaliação da confiabilidade, natureza, conceitos-chave e lógica interna do texto, bem como do contexto de produção. Excluídos aqueles que não cumpriam as impressões mínimas quanto aos requisitos citados restaram 25 artigos a serem analisados.

A revisão foi iniciada a partir de uma leitura de destaque, na qual buscamos a formação de impressões gerais sobre possíveis elementos recorrentes ou discordantes, o contexto de produção e o cenário clínico por trás dos dados disponíveis nos artigos.

Após a organização inicial das informações e evidências, decidiu-se pela realização da revisão de literatura seguindo três eixos temáticos. O primeiro deles, intitulado

“Metformina”, busca revisar o histórico de utilização da medicação, sua importância clínica e seus efeitos terapêuticos e colaterais. O segundo eixo, “Vitamina B12”, organiza as informações referentes à importância deste micronutriente para o organismo humano, destacando os efeitos de sua deficiência. Por fim, no eixo intitulado “Metformina e Hipovitaminose B12: Correlações na Literatura”, buscamos sistematizar as evidências de associação entre o uso de Metformina e a ocorrência de deficiência de Vitamina B12, de modo a destacar a ocorrência de informações convergentes, divergentes ou complementares, bem como identificar e detalhar as recomendações advindas dos trabalhos estudados.

5 METFORMINA

A prevalência de diabetes tipo 2 (DM2) aumenta rapidamente em todo o mundo, resultado principalmente do aumento das taxas de obesidade na população. Este aumento da prevalência da doença exige que tratamentos sejam baratos e eficazes, devido a sua elevada utilização.⁹

A Metformina (cloridrato de 1,1-dimetilbiguanida) é um dos antidiabéticos orais mais utilizados para o tratamento de DM2.⁹ Pertence à classe das biguanidas, medicamentos que são derivados da guanidina. Seu ingrediente ativo, extraído da arruda-caprária ou galega (*Galega officinalis*), também foi utilizado na Europa Medieval para o tratamento de diabetes mellitus (DM).⁴

Continua o principal medicamento da classe das biguanidas a ser utilizado, e ainda é o agente inicial preferido para DM2, caso não haja contra-indicações⁹ com base em uma recente decisão conjunta da *American Diabetes Association* (ADA) e da *European Association for the Study of Diabetes* (EASD), assim como da *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE).^{1, 10, 11}

A Metformina tornou-se disponível no Reino Unido em 1958 e entrou no mercado canadense em 1971.¹² A *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos aprovou seu uso em Dezembro de 1994^{4, 13} para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 em adultos, com indicação pediátrica para pacientes maiores de 10 anos.¹

A Fenformina, outra medicação da classe das biguanidas, introduzida em um momento semelhante, foi retirada do mercado devido à sua forte associação com a ocorrência de acidose láctica. Embora a Metformina possa aumentar a oxidação de lactato, não altera a liberação de lactato no músculo ou a concentração plasmática do mesmo, o que torna sua associação com a acidose láctica muito rara.⁹

Antes da introdução da Metformina, sulfonilureias eram a primeira linha de terapia oral para DM2, com eficácia também demonstrada. Isso levou a debates sobre qual medicamento deveria ser considerado base do tratamento da DM2 quando a Metformina foi disponibilizada. Em 1995, Campbell e Howlett fizeram uma metanálise de estudos prospectivos, controlados e randomizados já publicados que

comparavam Metformina e sulfonilureias. Encontraram 11 estudos aceitáveis envolvendo 656 pacientes e concluíram que ambos os medicamentos atingem um controle glicêmico semelhante, diminuindo a hemoglobina glicosilada (HbA1c) em 1,2%. A Metformina, porém, demonstrava maiores benefícios em relação à perda de peso.⁹

Bailey e Turner, em uma revisão realizada em 1996, também concluíram que a Metformina poderia alcançar um controle glicêmico semelhante ao de sulfonilureias e que, ao contrário destas, a Metformina não causa ganho de peso, hipoglicemia ou aumento das concentrações de insulina. Até o presente momento, o *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) é o estudo mais importante na avaliação da ação da Metformina em comparação com outros tratamentos e o Diabetes Prevention Program (DPP) o ensaio mais relevante em termos de prevenção do diabetes.⁹

5.1 MECANISMO DE AÇÃO

Os mecanismos de ação da Metformina são pouco compreendidos. Ela é eficaz apenas na presença de insulina e melhora a hiperglicemia basicamente pela supressão da gliconeogênese hepática.⁴ A Metformina tem mostrado capacidade de reduzir a glicemia de jejum e de diminuir a HbA1c em aproximadamente 1,0%.¹

Esse medicamento ativa a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), um sensor celular de energia ativado sob estresse metabólico induzido pelo exercício, hormônios, citocinas e medicações. A ativação da AMPK tem um efeito inibitório sobre a gliconeogênese hepática,⁴ melhora a sensibilidade à insulina e a absorção de glicose pelo músculo, induz a oxidação de ácidos graxos e inibe a acetil-CoA carboxilase.⁹

A ativação da AMPK pela Metformina é dependente da dose e do tempo de uso da Metformina. A fosforilação da treonina 172 é necessária para que ocorra esta ativação, sendo que a principal quinase responsável por este processo advém do gene LKB1.⁹

A Metformina aumenta a captação de glicose no músculo sem produção extra de lactato e melhora a absorção de glicose periférica, aumentando a ligação da insulina aos receptores de insulina (RI) enquanto eleva a fosforilação e a atividade de quinase da tirosina do RI. Os seus mecanismos de ação também incluem liberação de incretina, diminuição do depósito de amiloides,⁹ incremento na secreção de Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) e realce na sensibilidade deste peptídeo.⁴

Como demonstrado em estudos realizados em animais, a Metformina altera o metabolismo de ácidos biliares, aparentemente devido à diminuição da absorção dos mesmos no íleo por redução do transporte ativo, independente das bombas de sódio e potássio. Esse mecanismo poderia explicar os efeitos gastrointestinais da Metformina e suas propriedades hipolipidêmicas, assim como pode estar envolvido no controle glicêmico, pois ácidos biliares ativam o receptor TGR5 acoplado à proteína G, o qual pode estimular a liberação de GLP-1 pelas células.⁹

Estudos epidemiológicos retrospectivos apontam para uma possível associação entre a Metformina e a diminuição do risco de câncer, dados suportados e corroborados por estudos in vitro e em animais. O câncer de mama é aquele cuja relação com a Metformina é a mais estudada. A revisão "Metformin effects revisited" cita estudos em que a porcentagem de Resposta Patológica Completa, em pacientes com câncer de mama invasivo tratados com quimioterapia neoadjuvante, foi significativamente maior nos pacientes diabéticos tratados com Metformina do que nos não tratados com Metformina. Não houve diferença na taxa de sobrevivência entre os grupos.⁹

A Metformina pode também proteger contra a lesão celular tubular da nefropatia diabética, bloqueando o eixo AGEs-RAGE-ROS (produtos avançados de glicação - receptores para produtos avançados de glicação - espécies reativas de oxigênio).¹⁴

A meia-vida ($t_{1/2}$) da formulação padrão é de cinco horas. No entanto, uma formulação de liberação prolongada (posologia de uma vez ao dia), também está disponível. A Metformina é eliminada principalmente pela depuração renal e é excretada inalterada na urina.¹

5.2 APLICAÇÃO CLÍNICA

Atualmente, muitas diretrizes de prática clínica para pacientes com diabetes tipo 2, incluindo a ADA e a EASD, recomendam que o tratamento com Metformina, na ausência de contraindicações, deve começar no momento do diagnóstico de diabetes, sendo associado a modificação do estilo de vida. Além disto, a Metformina é preferencialmente selecionada para terapia de combinação com sulfonilureias ou insulina para conseguir atingir a meta glicêmica.¹³

Trata-se de um dos vários agentes anti-hiperglicêmicos que se mostra cardioprotetor e está associada com redução de eventos cardiovasculares, uma das principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes diabéticos do tipo 2.⁴ Em termos de hipoglicemia, a Metformina demonstrou a sua segurança.⁹

A Metformina pode também ser utilizada para tratar outras condições que envolvam resistência insulínica, tais como a síndrome do ovário policístico (SOP), tendo efeitos benéficos no metabolismo de carboidratos, na perda de peso e na proteção vascular.¹⁰

Os efeitos colaterais mais comumente reportados com o uso de Metformina são sintomas gastrointestinais, que ocorrem em 22% dos pacientes e incluem dor abdominal, náuseas e vômitos. Estes efeitos podem ser leves e de natureza transitória e muitas vezes evitados titulando-se gradualmente a dose, tomando-se o medicamento com as refeições ou tomando sua formulação de liberação lenta.^{1,9}

Os efeitos secundários adicionais documentados da Metformina são raros, mas incluem alterações do paladar, diminuição da absorção de vitamina B12 e erupções cutâneas.¹ Além disso, o tratamento com Metformina associa-se com a diminuição da concentração de folato, embora o mecanismo deste efeito adverso não tenha sido elucidado.⁸

A acidose láctica é muito rara (4,3 casos por 100.000 doentes-ano), provavelmente devido ao fato de que a Metformina não muda o nível de lactato plasmático.⁹ Ainda assim, as preocupações com esse risco levaram a uma advertência para o uso em populações específicas, incluindo aquelas com insuficiência renal ou hepática,

insuficiência cardíaca congestiva aguda, sepse, desidratação e consumo excessivo de álcool. Além disso, recomenda-se que a terapêutica seja temporariamente interrompida antes da administração de agentes de radiocontraste intravascular ou de procedimentos cirúrgicos, devido ao potencial para a desidratação e/ou lesão renal aguda.¹

6 VITAMINA B12

A vitamina B12 representa um modelo único de interações entre cobalto, nitrogênio e moléculas de carbono para o transporte e intercâmbio de radicais metabólicos. Marcando sua presença na história das ciências biológicas do século 20, o composto levou à atribuição de vários prêmios Nobel entre os anos trinta e sessenta.¹⁵

A vitamina B12 é também referida como cobalamina (Cbl) na literatura. O termo "vitamina B12" refere-se aos componentes da dieta que suportam o metabolismo adequado em mamíferos e "cobalamina" para os relacionados com as propriedades estruturais, metabólicas e moleculares das diferentes isoformas.¹⁵

6.1 METABOLISMO E FUNÇÃO NO ORGANISMO

A vitamina B12 é um composto hidrossolúvel e possui papel fundamental na síntese do DNA, na hematopoiese e no desenvolvimento neurológico, sendo que sua principal fonte na dieta é a proteína animal.⁶

A compreensão detalhada do transporte da vitamina começou na década de 1960, com trabalhos pioneiros relativos à identificação e purificação de suas três proteínas de ligação: o fator intrínseco gástrico (FI), haptocorrina e transcobalamina (TC).¹⁵

Uma vez na cavidade oral, a vitamina B12 se liga à proteína R secretada pelas glândulas salivares e o início da sua metabolização ocorre no estômago, por ação da pepsina e do ácido gástrico. No duodeno, em meio alcalino, a proteína R é hidrolisada pelas enzimas pancreáticas, liberando novamente a vitamina B12, que então se liga ao fator intrínseco (FI) secretado pelas células parietais gástricas. Este complexo vitamina B12-FI é altamente resistente à proteólise e alcança receptores específicos na mucosa do íleo terminal, onde é absorvido por um processo mediado por cálcio.¹⁵

A vitamina B12 chega ao meio extracelular após a degradação do IF e se liga ao carreador transcobalamina II (TC II), sendo posteriormente liberada na circulação.

Este complexo vitamina B12-TC II é ativado e utilizado pelo fígado, medula óssea e outras células. Por fim, o fígado é o principal local de armazenamento da vitamina B12, correspondendo a cerca de 90% do seu valor total.⁶

A vitamina B12 é um micronutriente chave responsável pela metilação do DNA, tendo várias ações metabólicas que incluem o metabolismo lipídico e a disfunção endotelial. Estudos mostram associação de baixos níveis de vitamina B12 com doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio e doença isquêmica cerebral.⁵

Adicionalmente, a deficiência de vitamina B12 também provoca complicações microvasculares como a neuropatia, podendo agravar quadros já existentes devido a outras condições, a exemplo da própria diabetes.⁵

6.3 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B12

O armazenamento corporal de Cobalamina é expressivo (cerca de 2500 mg) em comparação com a perda/necessidade diária (cerca de 1-2 mg), justificando um intervalo de 12 a 15 anos para seu esgotamento.⁴

Várias causas ou distúrbios associados à má absorção de Cobalamina têm sido relatados, sendo as mais comuns idade, gastrite atrófica, doença gástrica associada à infecção por *Helicobacter pylori*, e o uso dos inibidores de bomba de prótons, antagonistas dos receptores H2 e Metformina. Em vários estudos publicados, especialmente em pacientes idosos, a síndrome de má absorção alimentar de Cobalamina parece ser a principal causa para a deficiência da mesma, responsável por cerca de 50 a 60% dos casos. A anemia perniciosa é responsável por cerca de 15 a 30% dos casos.⁴

As reduções de Cobalamina e folato podem resultar em anemia megaloblástica.^{4,15} Em adição à anemia, a deficiência de vitamina B12 pode aumentar a gravidade da neuropatia periférica em pacientes com DM2. Além disso, por participar na via mais importante do metabolismo da homocisteína (Hcy), a redução da vitamina B12

aumentaria suas concentrações plasmáticas, sendo fortemente associada às doenças cardiovasculares em pacientes com DM2 e SOP.^{4,10}

As deficiências de vitaminas B12 e B6 podem contribuir para déficits neurológicos.^{15,17} Sabe-se que a deficiência de Cobalamina provoca a desmielinização do sistema nervoso seguido de degeneração axonal e morte neuronal, não só nos nervos periféricos como também nas colunas lateral e posterior da medula espinhal e do cérebro. Clinicamente, as primeiras manifestações são dormência e parestesia nos membros inferiores, o que, a menos que a deficiência seja corrigida, podem evoluir para fraqueza muscular, ataxia, distúrbio dos esfíncteres, e alterações do estado mental.⁴

A ocorrência de deficiência de Cobalamina foi associada com um aumento do risco de depressão e pior desempenho cognitivo. Pacientes com deficiência de Cobalamina tiveram 2,4 vezes mais chance de depressão e uma pontuação 1,79 pontos menor na performance cognitiva.¹⁶

A deficiência de vitamina B12 produz também, em menor escala, eventos tromboembólicos, infertilidade e aborto espontâneo recorrente.¹⁵

Franca deficiência de Cobalamina aumenta com a idade em indivíduos não diabéticos, enquanto a deficiência funcional (Cobalamina normal, mas níveis elevados de ácido metilmalônico - AMM) está aumentada em pacientes com DM2 (independentemente do uso de Metformina) e associada a uma triplicação da frequência de neuropatia.¹⁷

O significado clínico de uma baixa concentração da vitamina B12 no sangue, na ausência de manifestações de deficiência, é uma questão ainda em debate.¹⁵

A prevalência da deficiência de vitamina B12 é alta em pacientes com DM2 e está associada a parâmetros lipídicos adversos. Orientações de diretrizes/*guidelines* do diabetes tipo 2 devem incluir a recomendação para dosagens regulares de níveis de B12, especialmente para aqueles em tratamento com Metformina.⁵

7 METFORMINA E HIPOVITAMINOSE B12: CORRELAÇÕES NA LITERATURA

Diversos estudos encontrados na literatura têm demonstrado um aumento da frequência da deficiência de vitamina B12 entre os pacientes com DM2, sendo que o principal fator associado a esses casos de deficiência tem sido o uso da Metformina.^{1, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 17, 18, 19}

Na ausência de contraindicações como insuficiência renal e hepática, a Metformina é considerada um dos pilares no tratamento do DM2, sendo amplamente utilizada como terapia de primeira linha para a doença.^{3, 5, 7, 8, 20} É considerada ainda como um dos agentes antidiabéticos relacionados à redução da morbimortalidade por eventos cardiovasculares, os principais responsáveis por óbitos nos diabéticos.^{4, 8} Os maiores *guidelines* que abordam a prática clínica em DM2 recomendam o uso da Metformina associado a modificações do estilo de vida logo ao diagnóstico da doença.³

7.1 NEXO CAUSAL

A relação entre o uso da Metformina e a redução da absorção da vitamina B12 vem sendo descrita na literatura desde 1969. O primeiro caso de anemia megaloblástica por deficiência de vitamina B12 associada ao uso a longo prazo da Metformina foi descrito em 1980. Desde então, estudos observacionais e intervencionistas vêm corroborando a existência dessa associação.⁴

Esta deficiência de vitamina B12, por ser um efeito adverso que comporta-se inicialmente de forma assintomática e com evolução insidiosa, pode ser subvalorizada clinicamente, promovendo subdiagnósticos e aumento da morbidade relacionada a esta deficiência.³

Aproximadamente 10 a 30% dos pacientes que fazem uso de Metformina apresentam redução na absorção de vitamina B12, sendo que sua deficiência se torna evidente após os primeiros 10 a 12 anos do início do uso da medicação, não necessariamente com a presença de manifestações clínicas. Além da duração do

tratamento com Metformina, foi evidenciado que o risco de desenvolver deficiência dessa vitamina sofre influência também da idade e da dose prescrita.^{3, 4, 5, 6, 7, 12, 16}

A redução dos níveis séricos de vitamina B12 inicia-se nos primeiros três a quatro meses após a introdução da Metformina. A deficiência sintomática, de acordo com os estudos, ocorre apenas após cinco a 10 anos de uso do medicamento. Tal fato pode ser explicado pelos grandes estoques corporais da vitamina B12, comparados com sua pequena perda diária. Seu consumo por completo pode demorar entre 12 e 15 anos.^{4, 7}

Wulffelé realizou o primeiro ensaio clínico randomizado e placebo-controlado que demonstrou os efeitos do tratamento com Metformina nos níveis séricos de homocisteína, folato e vitamina B12. Foram analisados durante 16 meses 390 pacientes portadores de DM2. Destes, aleatoriamente, 196 pacientes receberam diariamente 2050mg de Metformina e 194 pacientes receberam placebo. Ao final dos 16 meses foi identificado um aumento de 4% nos níveis séricos de homocisteína nos pacientes em uso da Metformina e uma redução de 7% nos valores de folato e de 14% nos de vitamina B12. Ainda não se compreendia ao certo a importância clínica do aumento dos valores séricos de homocisteína.²¹

De Jager deu continuidade ao estudo iniciado por Wulffelé até completar-se quatro anos de seguimento da mesma amostra. Ao final do projeto, o tratamento com Metformina foi associado a uma redução de 19% nos valores de vitamina B12, redução de 5% nos valores de folato e aumento de 5% nos valores de homocisteína. O risco de se desenvolver deficiência de vitamina B12 encontrado pelo estudo foi 7,2% maior no grupo em uso de Metformina comparado ao grupo placebo (P=0.004).⁸

De Jager concluiu que o uso da Metformina reduz significativamente os níveis de vitamina B12 e que essa redução não é um fenômeno transitório, mas sim permanente e progressivo. Uma redução pequena dos níveis de folato foi encontrada nos pacientes em uso de Metformina comparado ao grupo placebo, porém não teve significância estatística quando ajustados de acordo com índice de massa corpórea e tabagismo. Além disso, mostrou aumento nos níveis de

homocisteína nos indivíduos cuja redução nos valores de vitamina B12 foi considerada indicativa de tratamento.⁸

7.2 VARIÁVEIS ASSOCIADAS

Sun – Hye Ko estudou, durante o ano de 2014, 799 pacientes diabéticos tipo 2 em uso de Metformina por pelo menos 03 meses, obtendo resultados que corroboram a relação entre a dose e o tempo de uso da medicação com os níveis séricos de vitamina B12, sendo que quanto maior a dose e o tempo de tratamento, maior a deficiência da vitamina.^{3, 6} O tempo de instalação da DM2 e a presença de complicações microvasculares não interferiram no desenvolvimento da deficiência de vitamina B12.³

Em um estudo transversal realizado em Porto Alegre com 147 pacientes que utilizaram Metformina por mais de um ano a prevalência de deficiência da vitamina B12 foi de 25%, sendo que os valores da vitamina foram inversamente proporcionais à idade dos pacientes estudados. Nesse estudo, os níveis séricos de vitamina B12 não foram associados à dose de Metformina, mas ao tempo de tratamento com a mesma.²⁰

Antony Sunil realizou um estudo em que analisou pacientes com DM2 de dois centros secundários, um europeu e um indiano, avaliando os valores séricos de vitamina B12, folato e o perfil lipídico. O estudo demonstrou relação entre a deficiência de vitamina B12 nos pacientes de diferentes grupos étnicos com parâmetros lipídicos adversos e aumento do risco cardiovascular. Essa hipótese foi justificada pelo fato da vitamina B12 funcionar como uma coenzima na reação de isomerização do metilmalonil coA (MM-CoA) em succinil coA. Esta reação é prejudicada pela deficiência de vitamina B12, resultando em acúmulo de MM-CoA e consequente restrição na inibição das enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, causando lipogênese. As principais alterações encontradas foram a redução dos valores de High Density Lipoprotein (HDL) e o aumento dos níveis de triglicerídeos.⁵

7.3 MECANISMO FISIOPATOLÓGICO

Os mecanismos responsáveis pela associação entre Metformina e deficiência de vitamina B12 ainda são controversos. As hipóteses incluem a inibição competitiva ou inativação da absorção de vitamina B12, alterações no fator intrínseco, redução da motilidade intestinal favorecendo a proliferação bacteriana e reduzindo a absorção da vitamina, modificações na estrutura morfológica do íleo e a competição da Metformina com o cálcio na membrana intestinal, gerando má absorção de nutrientes.¹⁶

A Metformina mostrou-se também prejudicial à ativação cálcio-dependente da membrana ileal responsável pela captação do complexo vitamina B12-fator intrínseco. A suplementação de cálcio, embora tenha melhorado a absorção desta, não aumentou os níveis de vitamina B12.^{3, 4, 6, 7, 8}

7.4 RASTREIO, DIAGNÓSTICO E QUADRO CLÍNICO

O diagnóstico da deficiência de vitamina B12 associada ao uso de Metformina se baseia, principalmente, na combinação entre a história pregressa, exame clínico, presença de sinais e sintomas neuropsiquiátricos sugestivos e a análise laboratorial confirmando a deficiência da vitamina (alterações hematológicas, níveis séricos de vitamina B12 reduzidos e de homocisteína e ácido metilmalônico elevados).⁴

Devem ser investigadas outras possíveis causas de deficiência de Cobalamina, que pode ocorrer também devido à ingestão inadequada ou à redução da sua absorção. Inicialmente, duas situações devem ser excluídas: a anemia perniciosa e a síndrome de má absorção, ambas muito comuns nos pacientes idosos.⁴

Clinicamente, a deficiência de vitamina B12 pode se expressar com anemia megaloblástica, alterações do estado mental e disfunções neurológicas. Vale ressaltar que apenas 60% dos pacientes com a deficiência possuem anemia, sendo que metade destes são assintomáticos.⁵

Quanto aos sintomas neurológicos, há destaque para os quadros de parestesia, redução da sensação vibratória e da propriocepção, os quais podem contribuir para o agravamento da neuropatia periférica decorrente do próprio diabetes.^{3,5}

A progressão do dano neurológico gerado pela deficiência de Cobalamina pode ser interrompida a partir da detecção precoce desses sintomas e de sua suplementação. Caso seja diagnosticada erroneamente como neuropatia diabética, as alterações neurológicas podem se tornar irreversíveis.³

Biemans realizou um estudo no qual comprovou também a relação entre a deficiência de cobalamina e um risco maior de depressão e piora cognitiva entre pacientes portadores de DM2.⁴

A relevância clínica da deficiência de vitamina B12 associada ao uso da Metformina ainda é questionada e não está estabelecida uma rotina de rastreio.^{3,4} Apesar disso, a monitorização dos seus níveis séricos é recomendada em pacientes diabéticos, especialmente os que fazem uso prolongado do medicamento. Estudos indicam a dosagem de vitamina B12 antes da introdução da Metformina, na avaliação anual de idosos com história de uso prolongado (\geq três a quatro anos), em pacientes que fazem uso de altas doses ($\geq 2\text{g}/\text{dia}$) e em caso de piora clínica da polineuropatia periférica, independente de alterações hematológicas.⁷ Concluiu-se que é necessária maior atenção dos médicos quanto à possibilidade dessa associação.^{3,4}

Destacamos ainda que a hipovitaminose B12 deve ser suspeitada em todo paciente em uso de Metformina que apresente os seguintes sinais de alarme na coleta da história clínica, exame físico ou exames laboratoriais: (1) células macrocíticas no esfregaço de sangue periférico, com ou sem a presença de anemia, e um aumento do volume corpuscular médio (VCM); (2) presença de neutrófilos hipersegmentados no esfregaço de sangue periférico; (3) pancitopenia de causa não definida; (4) manifestações neuropsiquiátricas inexplicadas, especialmente demência, fraqueza, ataxia sensorial, parestesias ou piora da neuropatia periférica prévia causada pelo diabetes; (5) pacientes diabéticos idosos em uso de altas doses de Metformina com complicações da neuropatia periférica, com ou sem alterações hematológicas.⁴

Apesar da dosagem de vitamina B12 sérica ser a mais utilizada para o diagnóstico devido ao baixo custo, não possui sensibilidade muito elevada, podendo apresentar

valores normais em pacientes com deficiência. Nestes casos, níveis séricos de AMM e Hcy elevados permitem a identificação precoce da hipovitaminose.²⁰

O rastreio da deficiência de vitamina B12 entre os pacientes com DM2 não difere do realizado na população em geral. A dosagem da vitamina B12 sérica é o passo inicial.^{4, 7} À análise dos resultados laboratoriais, não existem valores padrões para interpretar os níveis de cobalamina, havendo divergência entre os estudos. Em geral é realizada da seguinte forma: valores maiores que 300pg/ml são considerados normais, tornando improvável a deficiência da vitamina; entre 200 e 300pg/ml são limítrofes, quando a deficiência pode estar presente; por sua vez, quando menores que 200pg/ml, é confirmada a deficiência da vitamina.⁴

As dosagens de homocisteína e de ácido metilmalônico, que apresentam maior sensibilidade para o diagnóstico da deficiência de vitamina B12, devem ser reservadas para os casos suspeitos porém com dúvida diagnóstica, especialmente se existirem valores limítrofes de vitamina B12, sintomas neurológicos sem explicação ou quando se quer identificar uma causa tratável de uma disfunção cognitiva.^{4, 7}

Conhecer os níveis de Hcy e AMM é necessário para distinguir a deficiência de cobalamina da de folato, sendo que nesta ambos encontram-se reduzidos. Pacientes com deficiência de folato tratados erroneamente com vitamina B12 mantêm os níveis de homocisteína elevados, enquanto pacientes com deficiência de B12 tratados com reposição de folato mantêm níveis elevados de ácido metilmalônico.⁴

7.5 CONDUTA E SEGUIMENTO

Após realizar o diagnóstico da deficiência de cobalamina induzida pela Metformina, faz-se necessário o ajuste da medicação, regulação do diabetes com medicações orais ou insulina e reposição da vitamina para normalização de alterações hematológicas, além de prevenção e possível regressão dos sintomas, principalmente os neurológicos.⁴

Notamos que não há um consenso sobre o tratamento da deficiência "assintomática" da vitamina B12. Os estudos mostram, no entanto, que alguns sintomas são de difícil diagnóstico e podem ser irreversíveis, sendo que o tratamento é relativamente fácil, barato, seguro e eficaz, corroborando abordagens favoráveis ao tratamento.⁸

Não existem *guidelines* que orientem quanto ao modo ideal de realizar a suplementação de vitamina B12 nos pacientes DM2.⁴

Os suplementos orais de vitamina B12 são baratos e podem melhorar os resultados cognitivos dos pacientes com diabetes.¹² Entretanto, a quantidade de vitamina B12 disponível em multivitamínicos gerais (média de 6 mg) não é suficiente para corrigir a deficiência nos pacientes diabéticos em uso de Metformina.¹⁹

A via parenteral geralmente é preferível em pacientes com alterações neurológicas, por estas serem potencialmente irreversíveis. A reposição é realizada na dose de 1mg diariamente por uma semana, seguida de 1mg semanalmente por quatro semanas. A duração do tratamento depende da retirada do fator precipitante e, caso a Metformina seja mantida, a suplementação apropriada deve ser feita.^{4, 7}

Apesar do tratamento oral não possuir o desconforto e o alto custo das injeções, a recomendação de altas doses por essa via como tratamento definitivo ainda não foi totalmente validada na prática clínica.⁴

Para seguimento, exames laboratoriais devem ser realizados a fim de avaliar a resposta hematológica e metabólica. Durante os primeiros dias de tratamento via parenteral podem ocorrer elevações nos níveis séricos de ferro e bilirrubina indireta, além de queda brusca dos níveis de desidrogenase láctica. O paciente se sente melhor à medida em que se corrige a anemia. Também pode haver hipocalcemia durante a fase inicial do tratamento devido à utilização do potássio para a eritropoiese.⁴

As alterações neurológicas, quando presentes, começam a melhorar nos três primeiros meses, com máxima resolução em seis a 12 meses. O grau de melhora é inversamente proporcional à duração da doença.⁴

Quanto à prevenção, uma alternativa mais prática e custo-efetiva sugerida para evitar a deficiência de vitamina B12 é a realização de injeção anual de 1g da

mesma, que supre além das necessidades basais do paciente em uso prolongado de Metformina. Em adição, deve ser mantido o rastreio anual dos níveis da vitamina B12 e da polineuropatia periférica, desde o diagnóstico nos pacientes DM2 e após cinco anos nos pacientes com diabetes mellitus tipo 1.⁴

A prevalência elevada de pacientes portadores de DM2 em uso de Metformina que encontram-se sob risco de desenvolver hipovitaminose B12 demonstra a importância de se estabelecerem diretrizes e métodos simplificados para o diagnóstico e tratamento em questão, principalmente naqueles em uso prolongado da medicação. Apesar dos estudos não responderem com exatidão muitos dos questionamentos, comprova-se a importância deste tema no dia-a-dia da comunidade médica.²⁰

8 CONCLUSÃO

A Metformina é amplamente utilizada como terapia inicial no tratamento de pacientes com DM2 e tem se associado de maneira crescente à deficiência de vitamina B12 nestes indivíduos. Este aumento demonstra a necessidade de um manejo adequado dos processos de diagnóstico, conduta e seguimento desses pacientes, exatamente pela vitamina B12 ser um nutriente essencial e sua deficiência muito prejudicial.

Os profissionais de saúde devem estar atentos às evidências de que a Metformina reduz significativamente as concentrações de vitamina B12 de maneira não transitória, que persiste e agrava-se com a manutenção da medicação. Merecem atenção, também, as evidências que apontam para o incremento no risco de hipovitaminose B12 conforme o aumento da idade, dose e tempo de uso da Metformina. Estas duas últimas variáveis, que dizem respeito diretamente à administração da Metformina, são aquelas que apresentam maior consistência de associação causal.

Embora o valor sérico de vitamina B12 seja utilizado como indicativo de sua deficiência devido ao baixo custo, não apresenta alta sensibilidade diagnóstica. Os valores podem estar normais em uma significativa proporção de pacientes com deficiência de cobalamina, nos quais os valores de homocisteína e ácido metilmalônico permitiriam o diagnóstico mais precoce da deficiência.

A deficiência de vitamina B12 mostrou relação com resultados insatisfatórios no perfil lipídico e, desta forma, com um maior risco de doenças arteriais coronarianas, fazendo com que sua correção esteja relacionada também com a diminuição da morbimortalidade por doenças cardiovasculares nos pacientes com DM2.

Considerando a correlação entre a deficiência de cobalamina e o risco aumentado de desenvolver depressão, bem como de apresentar performance cognitiva comprometida, reafirmamos a necessidade de novos estudos para identificar a real efetividade da suplementação de vitamina B12 nos quadros de depressão e declínio cognitivo em pacientes DM2 em uso de Metformina. Adicionalmente e pela mesma razão, parece adequado a adoção de monitorização cognitiva rigorosa nos pacientes em uso da Metformina, principalmente em adultos maiores de 50 anos.

Destaca-se que o mecanismo causador da deficiência de cobalamina associada ao uso de Metformina ainda é controverso e que os protocolos que indicam este medicamento como pilar terapêutico no DM2 não fazem recomendações quanto à detecção e prevenção da deficiência de vitamina B12 durante o seu uso. Da mesma forma, ainda não existem publicações que orientem quanto ao rastreio e seguimento de pacientes DM2 durante o tratamento com Metformina.

Mantém-se, desta forma, um extenso contingente de pacientes diabéticos em uso de Metformina que não são submetidos a rotinas de monitorização dos valores de vitamina B12 e a busca ativa de sinais e sintomas, embora existam evidências de sua necessidade especialmente nos que fazem uso da medicação há mais de quatro anos e em doses maiores que 2g por dia.

Por fim, como consequência do pequeno número de ensaios clínicos abordando o assunto, ainda vigora a necessidade de elaborar consensos de rastreio e suplementação que visem a assistência integral aos pacientes, sem que eventuais efeitos colaterais de sua terapia tragam consequências muitas vezes graves, incapacitantes e irreversíveis.

REFERÊNCIAS

1. CORATHERS, S. D.; PEAVIE, S.; SALEHI, M. *Complications of Diabetes Therapy*. *Endocrinol Metab Clin*, v. 42, p. 947-970, 2013.
2. TAL, S. et al. *Association Between Vitamin B12 Levels and Mortality in Hospitalized Older Adults*. *Journal of American Geriatrics Society*, v. 58, n. 3, p. 523-526, 2010.
3. KO, S-H. et al. *Association of Vitamin B12 Deficiency and Metformin Use in Patients with Type 2 Diabetes*. *JKMS*, v. 29, p. 965-972, 2014.
4. MAZOKAPAKIS, E. E.; STARAKIS, I. K.; *Recommendations for diagnosis and management of metformin-induced vitamin B12 (Cbl) deficiency*. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 97, p. 359-367, 2012.
5. ADAIKALAKOTESWARI, A. et al. *Vitamin B12 deficiency is associated with adverse lipid profile in Europeans and Indians with type 2 diabetes*. *Cardiovascular Diabetology*, v. 13, p. 129-135, 2014.
6. PARIKH, S.; MATULIS, J. *Vitamin B12 Deficiency Associated With Metformin*. *The Endocrinologist*, v. 20, n. 1, p.38-40, 2010.
7. KIBIRIGE, D.; MWEBAZE, R. *Vitamin B12 deficiency among patients with diabetes mellitus: is routine screening and supplementation justified?* *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, v. 12, n. 1, p. 17-22, 2013.
8. JAGER, J. de. et al. *Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin-b12 deficiency: randomised placebo controlled trail*. *BMJ*, v. 340, c2181, 2010.
9. ANDÚJAR-PLATA, P.; PI-SUNYER, X.; LAFERRÈRRE, B. *Metformin effects revisited*. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 95, p. 1-9, 2012.
10. LIU, Q. et al. *Vitamin B12 Status in Metformin Treated Patients: Systematic Review*. *PLOS ONE*, v. 9, n. 6, e100379, 2014.
11. BEULEN, J. W. J. et al. *Influence of duration and dose of metformin on cobalamin deficiency in type 2 diabetes patients using metformin*. *Acta Diabetol*, 2014.
12. MOORE E. M. et al. *Increased Risk of Cognitive Impairment in Patients With Diabetes Is Associated With Metformin*. *Diabetes Care*, v. 36, p. 2981-2987, 2013.
13. KANG, D. et al. *Higher Prevalence of Metformin-Induced Vitamin B12 Deficiency in Sulfonylurea Combination Compared with Insulin Combination in Patients with Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study*. *PLOS ONE*, v. 9, n. 10, e109878, 2014.

14. ROCHETTE, L. et al. *Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1840, p. 2709-2729, 2014.
15. GUEANT, J-L.; ALPERS, D. H. *Vitamin B12, a fascinating micronutrient, which influences human health in the very early and later stages of life*. *Biochimie*, v. 95, p. 967–969, 2013. Editorial.
16. BIEMANS, E. et al. *Cobalamin status and its relation with depression, cognition and neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus using metformin*. *Acta Diabetol*, 2014.
17. FONSECA, V. A. et al. *Metanx in Type 2 Diabetes with Peripheral Neuropathy: A Randomized Trial*. *The American Journal of Medicine*, v. 126, p. 141-149, 2013.
18. TUNG, M. L.; TAN, L. K. *Long term use of metformin leading to vitamin B12 deficiency*. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 104, e75-e76, 2014.
19. REINSTATLER, L. et al. *Association of Biochemical B12 Deficiency With Metformin Therapy and Vitamin B12 Supplements*. *Diabetes Care*, v. 35, p. 327-333, 2012.
20. NERVO, M. et al. *Vitamin B12 in metformin-treated diabetic patients: a cross-sectional study in Brazil*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 57, n.1, p. 45-49, 2011.
21. WULFFELÉ, M. G. et al. *Effects of short-term treatment with metformin on serum concentrations of homocysteine, folate and vitamin B12 in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial*. *Journal of Internal Medicine*, v. 254, n. 5, p. 455-463, 2003.
22. NIX, W. A. et al. *Vitamin B status in patients with type 2 diabetes mellitus with and without incipient nephropathy*. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 107, p. 157-165, 2015.
23. OBEID, R. et al. *Serum vitamin B12 not reflecting vitamin B12 status in patients with type 2 diabetes*. *Biochimie*, v. 95, p. 1056-1061, 2013.
24. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *Clinical Guidelines Task Force. Global Guideline for Type 2 Diabetes*. 2012.
25. NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. *Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management*. *Lancet*, v. 378, p. 169-181, 2011.