

VITAMINA B12 E DESENVOLVIMENTO BUCAL: UMA DISCUSSÃO SOBRE A ETIOLOGIA MULTIFATORIAL DAS FISSURAS LABIOPALATINAS

VITAMIN B12 AND ORAL DEVELOPMENT: A DISCUSSION ON MULTIFATORIAL ETIOLOGY OF ORAL CLEFT

Márcia Regina Waltrick Zambuzzi

Nutricionista, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Unidade de Pesquisa Clínica/ Universidade Federal Fluminense

José Mauro Granjeiro

Cirurgião-Dentista, Doutor em Química, Unidade de Pesquisa Clínica/ Universidade Federal Fluminense

Willian Zambuzzi

Biólogo, Doutor em Bioquímica, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Unidade de Pesquisa Clínica/ Universidade Federal Fluminense

Erika Calvano Kuchler*

Cirurgião-Dentista, Doutora em Ciências Médicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Unidade de Pesquisa Clínica/ Universidade Federal Fluminense

Leonardo dos Santos Antunes

Cirurgião-Dentista, Doutor em Ciências Médicas, Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (FOUFF/NF)

Artigo de revisão realizado na Unidade de Pesquisa Clínica - Hospital Universitário Antônio Pedro/ Universidade Federal Fluminense.

Autor correspondente:
Dra. Erika Calvano Kuchler
Email: erikacalvano@gmail.com

Cresus Vinicius Depes de Gouvêa

Cirurgião-Dentista, Professor Titular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (FOUFF)

Cell Therapy Center (UPC), Hospital Universitário Antonio Pedro/ Universidade Federal Fluminense, Avenida Marquês de Paraná, 303, Niterói - RJ, 24030-215.

Tel: (21) 2629 2324; Fax: (21) 3701 1617.

Revisão de literatura

Palavras-chave: Anomalia Craniofacial. Fissura labiopalatina. Desenvolvimento craniofacial. Cobalamina.

Keywords: Craniofacial anomaly. Oral cleft. Craniofacial development. Cobalamin.

INTRODUÇÃO

Os defeitos congênitos ocorrem em cerca de 2 a 3% dos recém-nascidos e são os principais responsáveis pela mortalidade infantil nas nações desenvolvidas.

Dentre as malformações congênitas, as fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) destacam-se por representarem as anomalias craniofaciais mais comuns nos seres humanos. Durante de sua classificação, as FL/Ps podem estar associadas a síndromes (OMIN). Dentre outras características, as FL/Ps acarretam grave comprometimento estético e psicológico, além de alterações fonéticas. Além disso, as alterações fisiológicas e nutricionais acompanham os portadores desde o nascimento, devido à dificuldade de sucção e frequentes refluxos nasais (CAMPILLAY, 2010).

Diversos genes e *loci* candidatos foram associados à FL/P isolada em diferentes estudos e populações (VIEIRA, 2008). A etiologia multifatorial complexa da FL/P justifica a diversidade de resultados apresentados, em que inúmeros fatores ambientais e genes estão envolvidos com sua etiologia (VIEIRA, 2008).

Desta forma, a complexidade e a diversidade dos aspectos clínicos e dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento craniofacial proporcionam inúmeras oportunidades para investigação da etiologia da FL/P, visando a uma melhor compreensão do desenvolvimento embriológico e suas alterações.

Atualmente, sabe-se que a etiologia de diferentes doenças de origem embrionária está suportada por pilares multifatoriais, onde aspectos nutricionais posicionam-se em destaque.

Baseado na possibilidade de investigação de polimorfismos e na relevância da vitamina B12 durante o desenvolvimento embrionário, o presente estudo tem como objetivo realizar uma revisão de literatura focada na participação da vitamina B12 no desenvolvimento embriológico, discutindo a possibilidade de relação com a FL/P.

Espera-se que este estudo possa contribuir para o entendimento da etiologia de malformações craniofaciais, enfatizando a necessidade de aconselhamento nutricional para gestantes em períodos críticos da gestação.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Fissura Labiopalatina

A FL/P é uma das anomalias mais comuns nos seres humanos, cuja incidência pode variar entre 1/500 a 1/2500 nascimentos, e de acordo com a localização geográfica, etnia e condição social (ERICKSON, 2010).

As FL/Ps são divididas em três grupos principais: fissura labial isolada (FL), fissura labial com fissura palatina (também denominada fissura labiopalatina - FLP) e fissura palatina isolada (FP). Estudos familiares sugerem que a FLP e a FP são duas malformações genéticas distintas (NATSUME, 1987).

Os diferentes tipos de fissuras possuem diferentes origens embriológicas, a saber (MOORE, 2005):

- Fissuras de Lábio Isolado (FL): Resultam de um desenvolvimento imperfeito do palato embrionário primário.
- Fissuras de Lábio com Palato (FLP): quando as fissuras labiais se estabelecem, frequentemente, a deformação do desenvolvimento facial impede o contato das cristas palatinas, quando elas giram para a posição horizontal, de tal forma que as fissuras do palato primário são frequentemente acompanhadas pelas do palato secundário (duro e mole).
- Fissuras de Palato Isolado (FP): podem resultar de falhas morfológicas das cristas palatinas, interferindo em sua fusão após o contato ter sido estabelecido, devido ao fato de o epitélio de revestimento não se romper ou não ser reabsorvido; ruptura após ter ocorrido a fusão das cristas; fusão e consolidação defeituosa do mesênquima das cristas palatinas.

Coletivamente, as FL/Ps apresentam grande impacto clínico requerendo cuidados médicos como os odontológicos, fonoaudiológicos e psicológicos durante toda a infância e adolescência.

SHAW *et al.* (1995) dirigiram um estudo de corte muito interessante, em que foram entrevistadas 731 mães de crianças com FL/P e 734 mães de crianças sem qualquer

malformação. O principal resultado obtido foi que mulheres que usaram suplementação vitamínica, durante a gestação, tiveram uma redução de 25 a 50% no risco de terem filhos com malformações, como a FL/P, quando comparadas às mulheres do grupo controle.

O estudo destas exposições é de grande importância, pois pode sugerir alterações em rotas metabólicas importantes para o desenvolvimento de FL/P.

Estima-se que exposições nutricionais ou ambientais podem contribuir diretamente em um terço dos casos de FL/P.

2. Vitamina B12

2.1 Algumas Propriedades

A vitamina B12 que faz parte de uma família de compostos orgânicos denominados genericamente de cobalaminas, é uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada exclusivamente por microrganismos, encontrada em praticamente todos os tecidos animais e estocada primariamente no fígado, na forma de adenosilcobalamina (HENRY *et al.*, 1999). A fonte natural de vitamina B12 na dieta humana restringe-se a alimentos de origem animal especialmente leite, carne e ovos.

Em países industrializados, estudos epidemiológicos mostraram uma prevalência da deficiência de vitamina B12 na população em geral, afetando cerca de 20%. Em países em desenvolvimento, como a Índia, México e Guatemala, foi verificada grande incidência de deficiência de vitamina B12 em gestantes, lactantes e crianças em período de amamentação (MONSEN & UELAND, 2003).

Além disso, estudos com crianças mais velhas, não-lactentes, no México e na Venezuela, demonstraram que 33 a 52% dos indivíduos deste grupo apresentavam baixos níveis plasmáticos de vitamina B12 (DIEZ-EWALD *et al.*, 1997).

A deficiência dessa vitamina pode ocasionar transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares (ALLEN, 2008), estando ela diretamente relacionada com a hiper-homocisteinemia (HHcy), um fator independente de risco cardiovascular e de danos neuronais (BELCASTRO *et al.*, 2010). Dessa forma, o diagnóstico precoce da deficiência de vitamina B12 é de grande importância para evitar danos patológicos irreversíveis. Entretanto, não há uma metodologia laboratorial considerada adequada, já

que as possibilidades metodológicas disponíveis apresentam entre outras consequências o problemas de sensibilidade e especificidade (OBEID *et al.*, 2004).

Devido a esses aspectos, essa deficiência deve ser considerada um importante problema de saúde pública, principalmente entre gestantes, pessoas idosas e indivíduos que adotam uma dieta estritamente vegetariana (LI, 2011).

2.2 FUNÇÕES METABÓLICAS DA VITAMINA B12

A vitamina B12 é essencial para a atividade de diversas reações bioquímicas, em que, em sua maioria, implica a redistribuição de hidrogênios e de carbonos. No organismo humano, funciona como um co-fator essencial para duas enzimas: metioninasintase e L-metilmalonil-coAmutase, ambas direta ou indiretamente envolvidas no metabolismo da homocisteína (Hcy).

A metioninasintetase promove a metilação da Hcy à metionina, tendo o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) como doador de grupamento metil e a metilcobalamina como co-fator. Após a metilação da Hcy, a metionina formada é condensada com o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na S-adenosilmetionina (SAM). Em seguida, por uma reação de desmetilação, forma-se a S-adenosil-homocisteína (SAH) com posterior hidrólise para liberar adenosina e Hcy, completando o ciclo (DIONISIO *et al.*, 2010). A metilação da Hcy serve para repor os estoques de SAM, quando a metionina dietética estiver em níveis baixos. A SAM é o único doador de grupamentos metil para numerosas reações de metilação, incluindo algumas essenciais para a manutenção da mielina (BELCASTRO *et al.*, 2010). Assim, além do aumento de Hcy, a deficiência de vitamina B12 causará diminuição da SAM e conseqüente redução de importantes reações de transmetilação do organismo, provocando defeitos desmielinizantes no sistema nervoso.

Outro problema decorrente da interrupção da conversão de Hcy em metionina é que o 5-MTHF, doador de grupamentos metil na reação, não pode ser convertido em tetraidrofolato (THF) eficientemente, ocasionando um sequestro de folatos na forma 5-MTHF, ocorrendo, assim, deficiências de outros metabólitos dos folatos, como o 5,10-metilenotetraidrofolato, co-fator fundamental na síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) (BARRIOS *et al.*, 1999). Desse modo, gerará um defeito na síntese de DNA, dificultando a divisão celular, enquanto que o ácido ribonucléico (RNA) e a síntese de

componentes celulares permanecem inalterados, produzindo macrocitose. Portanto, a interrupção da síntese de DNA na deficiência de vitamina B12 é secundária ao transtorno no metabolismo dos folatos .

2.3 Transcobalaminas: Transportadores Plasmáticos de Vitamina B12

No plasma, a vitamina B12 circula ligada às proteínas transportadoras denominadas transcobalaminas, que são três. A maior parte da vitamina B12 circula ligada à holo-Hc (COLLIN *et al.*, 2010). Uma outra porção é transportada pela holo-Tc (que representa, aproximadamente, 10% a 30% da fração circulante de vitamina B12, e uma pequena fração de vitamina B12 circula ligada à transcobalamina III (Tc III) (COLLIN *et al.*, 2010).

A holo-Hc é uma glicoproteína de transporte de, aproximadamente, 120 kDa, e, embora represente a maior fração de vitamina B12 circulante, é considerada inerte, porque não existem receptores celulares para holo-Hc nas células e, por sua função no organismo, ser pouco conhecida. A holo-Hc é liberada no plasma pelos granulócitos, podendo ocorrer reduções de holo-Hc circulante por decréscimo da massa total de granulócitos (HENRY, 1999). O aumento da massa de granulócitos na policitemia vera pode ser responsável por uma liberação maior de holo-Hc, elevando os níveis séricos de vitamina B12 (QUADROS, 2010), podendo mascarar uma possível deficiência, já que o aumento desta fração não representa maior disponibilidade de vitamina B12 por parte das células.

Dessa forma, a holo-Hc assume importância clínica, pois sua elevação produzirá falsos aumentos de vitamina B12 (QUADROS, 2010). De outro modo, diminuições de holo-Hc podem levar a níveis falsamente mais baixos de vitamina B12 sérica total, não representando deficiência real, pois esta fração não está disponível para utilização pelas células. Tem-se mostrado baixas concentrações de vitamina B12 não-explicadas foram associadas com baixa concentração de holo-Hc. Esses resultados indicam que a deficiência de holo-Hc poderia estar associada às causas comuns de baixa vitamina B12 (QUADROS, 2010). A deficiência de holo-Hc não leva às manifestações características da deficiência de vitamina B12 (QUADROS, 2010).

A holo-Tc, uma proteína de 43 kDa produzida no fígado, macrófagos e íleo, contém a fração biologicamente ativa da cobalamina, pois promove a entrada específica

da cobalamina em todas as células do corpo. A falta de holo-Tc resulta em anemia megaloblástica severa, mas os níveis séricos de vitamina B12 poderão estar normais, devido a valores mais elevados de holo-Hc (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2007).

Por representar a única fração acessível às células, surgiu interesse na possível dosagem da holo-Tc, preferencialmente quanto às dosagens de vitamina B12 total no soro/plasma (REFSUN *et al.*, 2001), como um marcador precoce de deficiência tecidual desta vitamina e um melhor indicador do balanço negativo e níveis de vitamina B12 intracelular.

A Tc III é, provavelmente, uma isoproteína da holo-Hc, não-saturada com cobalamina e, portanto, menos carregada. É liberada pelos granulócitos durante a coagulação *in vitro* e produzida por várias células como fibroblastos, macrófagos, enterócitos, células renais, hepatócitos, mucosa gástrica e endotélio (HENRY, 1999). A Tc III não foi ainda estudada quanto à sua função. Talvez atue como um lixeiro de metabólitos inúteis análogos da vitamina B12 que circulam pelo sangue. Alguns estudos sugerem que a Tc III transporta B12 rápida e exclusivamente para o fígado (BAKER *et al.*, 1998).

3. Polimorfismo Genético e Genes Candidatos

Os polimorfismos de um único nucleotídeo, também conhecidos como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), são formas variantes da sequência de DNA que podem estar presentes nos indivíduos de uma mesma população dentro de um espectro biologicamente normal. Referem-se à existência de dois ou mais alelos em um dado *locus*, com uma frequência alélica maior do que 1% na população.

Polimorfismos de genes candidatos às FL/P foram sugeridos através de estudos embriológicos em modelos animais, aberrações cromossômicas e estudos de ligação com famílias (MURRAY, 2002). Genes que, potencialmente, representam um papel na etiologia de uma determinada alteração de desenvolvimento, alteração no quadro fisiológico ou patológico são determinados como potenciais candidatos a esta alteração. A hipótese de que a forma variante pode estar associada à função alterada de um gene e que possa estar envolvido com a ocorrência da FL/P podendo ser analisado através das frequências desses polimorfismos.

O gene *TCN1* codifica a proteína transcobalamina I (TC I).

Existem 3 tipos de proteínas humanas de ligação da vitamina B12: o fator intrínseco gástrico (GIF), também conhecido como transcobalamina III; plasma transcobalamina II (TCN2) e transcobalamina I (TCN1), uma proteína ligante R. (OMIN). Transcobalamina é uma proteína plasmática que transporta a vitamina B12 para as células e, portanto, determina a sua disponibilidade celular. Polimorfismos em genes relacionados com a codificação destas proteínas têm sido associados com a etiologia de malformações craniofaciais. O gene da *TCN1* está localizado no cromossomo [11q11-q12](#) (OMIN).

Por outro lado, o gene *TCN2* codifica a proteína transcobalamina II (TC II), que atua como transporte primário da vitamina B12. Seu gene está localizado no cromossomo [22q11.2](#) e apresenta diversos polimorfismos descritos, dentre eles, uma mudança da citosina para guanina (C>G) na posição +776. Este polimorfismo leva à troca de uma prolina por uma arginina (pro259arg) e é comum na população caucasiana. [Miller et al. \(2002\)](#) analisou a influência do genótipo *TCN2* em índices de *status* B12, especificamente, eles estudaram B12 sérica total. A concentração média de vitamina B12 ligada foi significativamente maior nos indivíduos homozigotos para a forma de prolina em comparação com os homozigotos para a forma de arginina e heterozigotos.

Recentemente, [GUEANT et al. \(2007\)](#) estudaram, em diversas populações, a distribuição deste polimorfismo em *TCN2* em 1433 indivíduos saudáveis da Europa, Mediterrâneo, África Ocidental, China, México e os EUA, e em 251 oeste-africanos com malária grave. Os autores concluíram que o polimorfismo 776G pode ser propenso à pressão seletiva conferindo uma vantagem evolutiva para enfrentar os fatores ambientais, como a malária. Apenas um estudo até o momento avaliou a associação destes polimorfismos com FL/P. Avaliaram as famílias de pacientes portadores de FL/P e observaram um desequilíbrio de transmissão destes polimorfismos ([MARTINELLI et al., 2006](#)). Em um estudo realizado recentemente, [MOSTOWSKA et al. \(2010\)](#) [mostraram que polimorfismos](#) associados entre genes responsáveis pelo metabolismo de colina e folato poderiam influenciar o risco de FL/P.

DISCUSSÃO

Como discutido anteriormente, o caráter multifatorial da etiologia das FL/P envolve fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais, destacam-se o

consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo e *déficit* nutricionais acometidos durante o primeiro trimestre do período gestacional (MURRAY, 2002).

Nesta linha de discussão, a nutrição materna está indicada como um dos fatores ambientais que pode estar envolvida com eventos relacionados à FL/P. O efeito teratogênico da deficiência de vitaminas é conhecido desde 1914 (SCHUBERT *et al.*, 2002). Especificamente, a influência do ácido fólico (folato) e de vitaminas do complexo B tem sido investigada por diferentes grupos de pesquisadores desde a década de 60, uma vez que, em 1961, fora observado que sua deficiência alterava o desenvolvimento facial em embriões de camundongos (SCHUBERT *et al.*, 2002). Porém, somente anos depois, foi sugerido que a suplementação vitamínica periconcepcional poderia reduzir o aparecimento de FL/P em humanos (TOLAROVA, 1982). Além das FL/Ps, vários estudos demonstram que a suplementação vitamínica diminui a ocorrência de malformações do tubo neural, defeito na formação de membros, cardiopatias congênitas e anomalias do trato urinário em fetos.

Os eventos moleculares que levam às anomalias congênitas, devido à deficiência de folato, ainda não estão bem definidos. No entanto, podem incluir metilação insuficiente de metabólitos cruciais para o desenvolvimento embrionário, afetando eventos celulares de diferenciação e apoptose. Foi observado que níveis baixos de vitamina B12 e folato acarretam um aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína. Em gestantes, postulou-se a hipótese de que o alto nível de homocisteína poderia atuar como agente teratogênico, inibindo reações de metilação do DNA e a síntese de timina. Sendo assim, este processo induziria danos ao DNA, seguido por reações de excisão-reparo, quebras na fita de DNA, pausa no ciclo celular e apoptose. Desta forma, destaca-se a importância do suplemento adequado de vitaminas para as reações biológicas vitais. É possível que a homocisteína, por si só, induza algumas alterações no desenvolvimento, previamente atribuídas ao folato ou à deficiência de vitamina B12.

Cabe ressaltar que estudos com modelos animais demonstraram que a vitamina B12 é fundamental para o desenvolvimento embrionário normal da face e da cavidade oral. Além disso, como abordado anteriormente, estudos populacionais demonstram a importância da suplementação vitamínica materna, para a formação adequada do embrião humano. Vale ressaltar que a construção de uma saúde bucal saudável começa antes do nascimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os profissionais da área da saúde vêm buscando valorizar o período gestacional quanto aos cuidados maternos e do bebê, pois uma adequada atenção à gestação pode repercutir positivamente na saúde da criança. Neste contexto, a odontologia intra-uterina visa a uma melhor saúde bucal da criança, e se especula que a vitamina B12, aqui, desempenha importante papel. Embora fortes evidências apontem para o envolvimento de vitaminas em diferentes períodos gestacionais, novos estudos populacionais precisam ser realizados para melhor elucidar o papel de determinadas vitaminas, como a vitamina B12, no desenvolvimento da cavidade bucal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, L.H. [Causes of vitamin B12 and folate deficiency](#). Food Nutr Bull 2008;29 S20-34.
- Baker, H. Cobalamin (vitamin B12) and holotranscobalamin changes in plasma and liver tissue in alcoholics with liver disease. J Am Coll Nutr. 1998;17 235-8.
- Barrios, M.F. Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de sua deficiencia. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 1999;15 159-74.
- Belcastro, V.; Pierguidi. [Hyperhomocysteinemia recurrence in levodopa-treated Parkinson's disease patients](#). Eur J Neurol. 2010;5 661-5.
- Campillay, P.L.; Delgado, S.E. Avaliação da alimentação em crianças com fissura de lábio e/ou palato atendidas em um hospital de Porto Alegre. Rev. CEFAC. 2010;12 257-266. 2010.
- Collin, SM.; Metcalfe, C. [Circulating folate, vitamin B12, homocysteine, vitamin B12 transport proteins, and risk of prostate cancer: a case-control study, systematic review, and meta-analysis](#). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010;19 1632-42.
- Diez-Ewald, M. Prevalence of anemia, iron, folic acid and vitamin B12 deficiency in two Bari Indian communities from western Venezuela. Invest Clin. 1997;38 191-201.
- Dionisio, N.; Jardín, I. [Homocysteine, intracellular signaling and thrombotic disorders](#). Curr Med Chem. 2010; 17 3109-19.
- Erickson, R.P. [Genes, environment, and orofacial clefting: N-acetyltransferase and folic acid](#). J Craniofac Surg. 2010;21 1384-7.

Gueant, J.L.; Chabi, N.W. Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C-G variant in the transcobalamin gene (TCN2). *J Med Genet.* 2007;44 363-367.

Guerra-Shinohara, E.M.; Morita, O.E. [Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia.](#) *Metabolism.* 2003;56 339-47.

Henry, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 2. ed. São Paulo: Manole Ltda. Cap. 26, p. 621-5. 1999.

Li, D. [Chemistry behind Vegetarianism.](#) *J Agric Food Chem.* 2011;59 777-84.

Martinelli, M.; Scapoli, L. Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat.* 2006;27 294.

Miller, J.W.; Ramos, M.I. Transcobalamin II 775G-to-C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood.* 2002;100 718-720.

Monsen, A.L.B.; Ueland, M.P. Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *Am J Clin Nutr.* 2003;78 7-21.

Moore, L.K. Embriologia clínica. 5º ed., ed. Guanabara. 2005.

Mostowska, A.; Hozyasz, K.K. Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *J Med Genet.* 2010;47 809-15.

Murray, J.C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 2002;61 248-56.

Natsume, N. Incidence of cleft lip and palate among Japanese newborns, 1982 to 1984. *Plast Reconstr Surg.* 1987;79 499-501.

Obeid, R. Vitamin B12 status in the elderly as judged by available biochemical markers. *Clin Chem.* 2004;50 238-41.

OMIN: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/189905>

Quadros, E.V. [Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism.](#) *Br J Haematol.* 2010;148 195-204.

Refsum, H. [Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome.](#) *Br J Nutr.* 2001; 85 S109-13.

Schubert, E.L.; Hsu, L. [Single nucleotide polymorphism array analysis of flow-sorted epithelial cells from frozen versus fixed tissues for whole genome analysis of allelic loss in breast cancer.](#) *Am J Pathol.* 2002;160 73-9.

Shaw, G.M.; Schaffer, D. Periconceptional vitamin use, dietary folate and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiol.* 1995;6 219-26.

Tolarova, M. [Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip.](#) *Lancet.* 1982;2 217.

Vieira, A.R. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008;87 119-25.