

Análise do polimorfismo rs3761548 no gene *FOXP3* em pacientes portadoras de câncer de mama subtipo triplo-negativo

Analysis of rs3761548 polymorphism in the *FOXP3* gene in patients with triple-negative breast cancer

Roberta Losi Guembarovski¹, Leandra Fiori Lopes², Julie Massayo Maeda Oda³, Bruna Karina Banin Hirata¹, Patrícia Midori Murobushi Ozawa¹, Glaucio Akelington Freire Vitiello¹, Cintya Mayumi Ishibayashi⁴, Carolina Batista Ariza¹, Carlos Eduardo Coral de Oliveira¹, Maria Angelica Ehara Watanabe¹

¹Depto. de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR

²Faculdades Integradas de Ourinhos, Ourinhos, SP

³Curso de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Três Lagoas, MS

⁴Universidade Filadélfia, Londrina, PR, Brasil.

Endereço para Correspondência

Maria Angelica Ehara Watanabe

Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380 – CEP 86057-970 – Londrina-PR.

E-mail: maewatuel@gmail.com.

Resumo

Estudos envolvendo câncer de mama triplo-negativo são de fundamental importância clínica frente à falta de opções terapêuticas. A detecção da expressão do fator de transcrição FOXP3 (forkhead transcription factor 3) em células tumorais ou em células T regulatórias pode ser um importante fator prognóstico para pacientes com esta neoplasia. Polimorfismos no gene *FOXP3* podem alterar sua expressão ou a atividade da proteína, podendo ter implicações em processos tumorais, incluindo aquele da mama. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo analisar o polimorfismo genético (rs3761548) no *FOXP3*, que consiste em uma troca de base única C/A, em 50 pacientes com câncer de mama e em 115 controles, livres de neoplasia, através da técnica de PCR alelo-específica. O estudo caso-controle para o gene *FOXP3* indicou que pacientes com genótipo homozigoto AA possuem uma suscetibilidade quase 4 vezes maior para o desenvolvimento do câncer de mama triplo negativo (OR = 3,78, IC 95 % = 1,02-14,06). Não foram observados resultados significativos quando esta mutação foi analisada em relação aos parâmetros prognósticos: tamanho de tumor, comprometimento de linfonodos e grau nuclear. Assim sendo, frente a positiva associação observada entre uma mutação polimórfica no gene *FOXP3* e o subtipo tumoral de câncer de mama triplo-negativo, os resultados do presente estudo são sugestivos de que este fator de transcrição pode ter um envolvimento na patogênese mamária, o que deverá ser validado em estudos futuros envolvendo um maior número de amostras.

Palavras-chave: FOXP3, polimorfismo genético, câncer de mama, triplo-negativo

Abstract

Studies involving triple-negative breast cancer have fundamental clinical importance facing the lack of therapeutic options. The detection of the FOXP3 (forkhead transcription factor 3) expression in tumor cells or regulatory T cells may be an important prognostic factor for patients with this malignancy. Polymorphisms in *FOXP3* gene may alter its expression or protein activity, which may have implications in tumor processes, including that of the breast. Within this context, this work aimed to analyze the genetic polymorphism (rs3761548) in *FOXP3*, which consists of a single base exchange C/A, in 42 breast cancer patients and 115 controls neoplasia free, through the technical of allele-specific PCR. The case-control study for the *FOXP3* gene indicated that patients with homozygous AA genotype have almost 4-fold greater susceptibility to the development of triple-negative breast cancer (OR = 3.78, IC 95% = 1.02-14.06). No significant results were observed when this mutation was analyzed in relation to prognostic parameters: tumor size, lymph node involvement and nuclear grade. Thus, front to the positive association observed between a polymorphic mutation in the *FOXP3* gene and triple-negative subtype of breast cancer, the results of this study are suggestive that this transcription factor may have an involvement in the breast pathogenesis, which should be validated in future studies involving a large number of samples.

Keywords: FOXP3, genetic polymorphism, breast cancer, triple-negative.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma das neoplasias malignas mais comuns em mulheres e é responsável por uma grande parcela de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. No Brasil estimam-se 52.680 novos casos de câncer de mama para 2012 ⁽¹⁾.

Os tumores de mama são classificados histologicamente de acordo com o sítio de origem da neoplasia, dividindo-se em ductais e lobulares. Os ductais se desenvolvem nos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores, e as pacientes que apresentam este tipo de carcinoma mamário possuem maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que o verificado nas pacientes com tipos menos frequentes de carcinoma invasivo de mama ⁽²⁾.

O estadiamento do tumor e o grau de diferenciação histológica são classificações bastante utilizadas na clínica e são importantes na orientação do tratamento. O sistema de estadiamento mais utilizado é o Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC), o qual se baseia na extensão anatômica da doença, considerando as características do tumor primário, nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de metástases. A avaliação desses parâmetros permite a determinação do estadiamento que varia dos estágios I ao IV ⁽³⁾.

Tem sido demonstrado que o câncer de mama pode ser classificado em subgrupos biologicamente e clinicamente significativos. Um subgrupo que tem recebido muita atenção possui fenótipo de receptor de estrógeno (RE) negativo, receptor de progesterona (RP) negativo e fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) negativo, sendo denominado de triplo-negativo (TN) ⁽⁴⁾.

Estudos envolvendo câncer de mama triplo-negativo são de fundamental importância clínica frente à falta de opções terapêuticas. O significado prognóstico destes tumores permanece incerto desde que o grupo é heterogêneo e o pior prognóstico parece estar confinado àqueles que expressam citoqueratinas basais ou receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) ⁽⁵⁾. Terapias personalizadas, como a terapia *Biossaúde*, Londrina, v. 14, n. 2, 2012

endócrina e terapia anti-HER2, não são aplicáveis a câncer de mama triplo negativo ⁽⁶⁾. Portanto, para desenvolver novas estratégias contra o câncer de mama triplo negativo, é essencial entender as vias específicas que levam este subgrupo ao comportamento agressivo ⁽⁶⁾.

Os mecanismos que inter-relacionam os processos inflamatórios, imunidade e câncer têm sido muito discutidos. Importantes componentes nesta integração são as citocinas produzidas pelas células ativadas do sistema imune inato ou adaptativo que estimulam o crescimento tumoral e a progressão do câncer. Além disso, mediadores solúveis produzidos pelas células cancerosas recrutam e ativam células inflamatórias que estimulam a progressão tumoral. Entretanto, as células inflamatórias também podem produzir citocinas que limitam o crescimento do tumor ⁽⁷⁾. Estudos sobre os aspectos imunológicos que envolvem o microambiente tumoral do subtipo triplo negativo ainda são escassos na literatura, o que ressalta a importância de novos estudos.

As células T reguladoras (Tregs) naturais CD4+CD25+ atuam na supressão da ativação imune, funcionando como mediadores críticos da homeostasia imune e da auto-tolerância ⁽⁸⁾. A ausência de células T CD4+CD25+ leva ao desenvolvimento de doenças auto-imunes em uma grande variedade de animais normais ^(9,10). Entretanto, vários estudos recentes têm demonstrado que as células Tregs também são importantes no controle de todas as formas de respostas imunes no contexto de inflamação, infecção, alergia, transplantes e imunidade tumoral ⁽¹¹⁾. Foi descrito que as células Tregs CD4+CD25+ expressam especificamente o gene regulador *FOXP3*, o qual codifica uma proteína de ligação ao DNA chamada scurfin, e que possui ação repressora de transcrição ⁽¹²⁾. O *FOXP3* é considerado importante no desenvolvimento e função das células Tregs e, portanto, a expressão positiva deste fator de transcrição é utilizada como marcador específico destas células ⁽¹¹⁾.

Polimorfismos neste gene podem modificar funcionalmente ou quantitativamente a proteína *FOXP3*, levando a falta de funcionalidade das Tregs CD4+CD25+ e resultando em alguma doença autoimune ⁽¹³⁾, como por exemplo, o diabetes tipo I ⁽¹⁴⁾, ou mesmo o câncer.

Foram descritos polimorfismos de base única (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) em várias regiões no gene *FOXP3*, tais como região promotora, região intrônica ou não codificante e região exônica ou codificante. Autores têm descritos inúmeros SNPs para a região promotora: -6054 TAATA/(rs3060515); -5906 T/A (rs2869211); -3499 A/G (rs3761547); -3279 C/A (rs3761548); -2383 C/T (rs3761549); -1383 C/T (rs2232364); -924 A/G (rs2232365); 2 SNPs para a região intrônica: IVS1 +87 G/T (rs2232366); IVS5 -20 G/A (rs2232368); IVS9 +459 A/G (rs2280883) e SNPs nas regiões exônicas 1, 2, 3-4, 5-6, 7-8, 9, 10, 11 e 12 ^(14,15). O estudo destas variantes alélicas pode resultar em importantes informações sobre a regulação das Tregs em diversas patologias, incluindo o câncer de mama.

Dentro deste contexto, este estudo teve como objetivo estudar um polimorfismo genético no fator de transcrição *FOXP3* em pacientes com câncer de mama triplo negativo e em controles livres de neoplasia, bem como avaliar a presença desta mutação em relação a parâmetros prognósticos das pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento Experimental

Na primeira etapa do presente trabalho foi realizado um estudo de associação caso-controle para comparar a presença do polimorfismo proposto entre os dois grupos, *Biosáude*, Londrina, v. 14, n. 2, 2012

na busca por um marcador associado a uma maior ou menor suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama triplo-negativo. Paralelamente foi realizado um estudo transversal para avaliar a associação da presença do polimorfismo com os fatores prognósticos: grau nuclear, tamanho do tumor e metástase em linfonodos.

Seleção de Amostras

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro CONEP 5231/Plataforma Brasil No. CAAE 171231134,0000.5231). No Hospital do Câncer de Londrina e em uma Unidade Básica de Saúde de Londrina (UBS Orlando Sestari, Bairro União da Vitória) foram realizadas as entrevistas com cada doadora, pacientes e controles, respectivamente, que receberam as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido, para posterior coleta do material.

Foram obtidas 50 amostras de tecidos (embebidas em parafina) de tumores de mama triplo-negativos e 115 amostras de sangue periférico de mulheres livres de neoplasia.

Obtenção de dados clinicopatológicos das pacientes

A análise histopatológica foi realizada com coloração por hematoxilina-Eosina (HE) de rotina, para confirmação do diagnóstico de câncer de mama. A classificação histopatológica dos tumores foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores (CIT) O estadiamento clínico foi determinado de acordo com o sistema TNM (tumor/nódulo/metástase) do câncer. A análise imunohistoquímica para os marcadores HER2, RE e RP foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Câncer de Londrina.

Análise Molecular

Extração de DNA

A extração do material parafinado foi realizada com Xilol e Fenol-clorofórmio, segundo Isola et al. (16), com modificações. O DNA das amostras de sangue periférico foi extraído a partir de 200 µL do sangue total pelo Kit de Extração Mini Spin Plus (Biometrix, BioPur, Curitiba, Paraná, BR) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (ThermoScientific, Wilmington, Delaware, USA) nos comprimentos de onda 260/280nm.

Análise do polimorfismo no gene FOXP3

Aproximadamente 100 ng de DNA foram utilizados para amplificar o polimorfismo na região promotora do *FOXP3* cujos primers foram sintetizados de acordo com a sequência depositada no GenBank sob número de acesso NT_079573: (C/A, rs3761548). A localização do SNP na região promotora foi determinada a partir do local de início da transcrição (17).

As amostras foram amplificadas utilizando buffer plus com 1,25U de Taq polimerase (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA). As condições da reação de amplificação para o polimorfismo -3279 (C/A) foram 1,25mM de DNTP, 2,5µM de cada iniciador, 50mM de MgCl₂, 10% de Buffer, 1,25U de Taq polimerase e cerca de 100 ng de DNA. Inicialmente, uma etapa de desnaturação foi constituída por 10 min a 94°C, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 1 min a 67°C e 1 min a 72°C, e 10 min a 72°C em termociclador PCR-Sprint Hybaid - Guelph, Ontario, Canada.

Os fragmentos amplificados de 334 pb para FOXP3 -3279 (A) e 333 pb para FOXP3 -3279 (C) foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e corados com Nitrato de Prata (AgNO₃). Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador PCR Sprint ThermoHybaid (BioSystems, Guelph, Canada).

Análise estatística

Para o gene *FOXP3*, no qual os três genótipos são identificados, ou seja, homocigoto selvagem (CC), heterocigoto mutado (CA) e homocigoto mutado (AA), a significância estatística das frequências genotípicas entre pacientes e controles foi estimada a partir de uma tabela de contingência 3X2.

A análise do estudo de associação foi realizada através do cálculo da *Odds Ratio* (OR), com Intervalo de Confiança a 95% (IC=95%), através do programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.00 para Windows (Graph Pad Software, La Jolla California EUA, www.graphpad.com), como estimativa do Risco Relativo.

Os testes do Qui-Quadrado de Pearson e Correlação de Spearman foram utilizados na comparação entre os parâmetros de prognóstico e os genótipos de *FOXP3*, através do programa estatístico SPSS (versão 20). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A média de idade das pacientes foi de 54±13 anos. Para algumas pacientes, determinados dados dos prontuários não estavam disponíveis. Foi observado que das pacientes com as respectivas informações disponíveis, 83% apresentaram grau nuclear II ou III, 51% apresentaram comprometimento linfonodal e a média de tamanho tumoral foi de 3.5 cm.

Frequências genotípicas e estudo de associação caso-controle

O polimorfismo do gene *FOXP3* (*rs3761548*) foi analisado em 50 pacientes TN e em 115 controles, livres de neoplasia. A frequência genotípica foi 12% (6/50) e 3,48% (4/115) para o homocigoto AA, 34% (17/50) e 57,39% (66/115) para o heterocigoto CA e 54% (27/50) e 39,13% (45/115) para o homocigoto CC, em pacientes e controles, respectivamente (Tabela 1). O estudo de associação caso-controle indicou uma associação positiva para o homocigoto AA em relação à suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer TN (OR = 3,78, IC95% = 1,02 a 14,06).

Análise do polimorfismo genético em relação aos parâmetros prognósticos

Quando foram comparados os genótipos de *FOXP3* com os parâmetros prognósticos das pacientes, não foram observadas associações significantes em relação a tamanho tumoral ($p = 0,482$; $\rho = 0,102$), comprometimento linfonodal ($p = 0,890$; $\rho = -0,023$) e grau nuclear ($p = 0,682$; $\rho = -0,062$).

Tabela 1. Distribuição genotípica e estudo de associação caso-controle para o gene *FOXP3* em pacientes e controles

		Controles (n=115)	Pacientes (n=50)	OR	IC95%	p value (χ^2)
<i>FOXP3</i> rs3761548	CC	45 (39%)	27 (54%)	1.00	—	—
	CA	66 (57%)	17 (34%)	0.38*	0.19-0.76	0.006*
	AA	4 (4%)	6 (12%)	3.78*	1.02-14.06	0.035*
	CA+AA	70 (61%)	23 (46%)	0.55	0.28-1.07	0.077

DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença complexa, com grande heterogeneidade morfológica e biológica clínica. Sabe-se que tumores mamários com histologia semelhante apresentam prognósticos clínicos e respostas terapêuticas diferentes⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

O gene *FOXP3* é expresso em células CD4+ CD25+, em condições fisiológicas normais, e codifica a proteína FOXP3, a qual regula a ativação de células T, funciona como repressora da transcrição e sub-regula a expressão de citocinas em células T^(11,21).

A doença auto-imune observada em humanos e camundongos apresenta deficiência de FOXP3, o que indica que este fator de transcrição tem um papel crucial na regulação da função das células T⁽²²⁾. Além disso, tem sido sugerido que as células FOXP3-positivas em tumores podem ser um alvo terapêutico, o qual pode melhorar os resultados para esses pacientes⁽²³⁾. Assim, dada à elevada taxa de mutações somáticas em tumores de mama, a seqüência conservada e a regulação de vias importantes, pode-se considerar o gene *FOXP3* como um candidato interessante no contexto da suscetibilidade genética ao câncer⁽²⁴⁾.

Neste estudo, foi analisado um polimorfismo genético em *FOXP3* (rs3761548) em 50 pacientes TN e em 115 controles sem neoplasia (Tabela 1). Os resultados indicaram uma associação positiva para o genótipo homozigoto AA (OR = 3,78; IC95% = 1,02-14,06). Portanto, sugerimos que os indivíduos que herdaram duas cópias desta variante alélica possuem uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento deste subtipo de câncer de mama do que indivíduos com outros genótipos. Não existem artigos relacionando polimorfismo genético de *FOXP3* e susceptibilidade ao câncer TN na população brasileira, mas estão descritas associações positivas com outras doenças, como psoríase⁽¹⁷⁾ e rinite alérgica⁽¹⁵⁾. Raskin e Rennert⁽²⁴⁾ investigaram três polimorfismos genéticos no gene *FOXP3* em pacientes com câncer de mama, mas não do subtipo triplo-negativo, e não encontraram nenhuma associação significativa. Além disso, esses autores postularam que o gene *FOXP3* pode estar envolvido com o surgimento do câncer de mama hereditário, e com mutações de alta penetrância. Nossos resultados não estão de acordo com esses autores, uma vez que encontramos uma associação positiva entre uma mutação polimórfica específica no *FOXP3* e a suscetibilidade ao câncer TN (Tabela 1).

Apesar do baixo número de homozigotos observados em ambos os grupos, encontramos 12% de homozigotos AA no grupo TN contra apenas 4% no grupo controle, embora o último seja composto de um número muito maior de indivíduos. No presente estudo, não foram observadas correlações significativas em relação aos *Biosaúde*, Londrina, v. 14, n. 2, 2012

parâmetros prognósticos avaliados, o que pode ser devido ao tamanho amostral ou a real ausência de influência deste gene sobre a progressão do tumor. Assim, nossos resultados merecem cautela, pelo tamanho da amostra, mas uma vez que foi encontrada uma associação significativa entre uma variante genética no gene *FOXP3*, sugerimos que este fator transcrição pode ser um marcador promissor de suscetibilidade na patogênese do câncer de mama, especialmente no subtipo molecular triplo-negativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL (2011) Estimate 2012: Cancer Incidence in Brazil. INCA, Rio de Janeiro
2. Ketterhagen JP, Quackenbush SR, Haushalter RA. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 158:120-123, 1984.
3. Sobin LH, Wittekind CH (2002) TNM Classification of Malignant Tumours. In: ed. (ed)
4. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13:4429-4434, 2007.
5. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer*, 45 Suppl 1:27-40, 2009.
6. Kurebayashi J. Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. *Breast Cancer*, 16:275-280, 2009.
7. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117:1175-1183, 2007.
8. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature immunology*, 6:331-337, 2005.
9. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*, 22:531-562, 2004.
10. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*, 6:345-352, 2005.

11. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299:1057-1061, 2003.
12. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *The Journal of clinical investigation*, 112:1437-1443, 2003.
13. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Journal of medical genetics*, 39:537-545, 2002.
14. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics*, 55:149-156, 2003.
15. Zhang L, Zhang Y, Desrosiers M, Wang C, Zhao Y, Han D. Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population. *Human immunology*, 70:930-934, 2009.
16. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *The American journal of pathology*, 145:1301-1308, 1994.
17. Gao L, Li K, Li F, Li H, Liu L, Wang L, Zhang Z, Gao T, Liu Y. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *Journal of dermatological science*, 57:51-56, 2010.
18. Cianfrocca M, Gradishar W. New molecular classifications of breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 59:303-313, 2009.
19. Geyer FC, Marchio C, Reis-Filho JS. The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology*, 41:77-88, 2009.
20. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nature reviews Clinical oncology*, 6:718-730, 2009.
21. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 16:311-323, 2002.
22. Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nature reviews Immunology*, 4:889-899, 2004.
23. Watanabe MA, Oda JM, Amarante MK, Cesar Voltarelli J. Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis. *Cancer metastasis reviews*, 29:569-579, 2010.

24. Raskin L, Rennert G, Gruber SB. FOXP3 germline polymorphisms are not associated with risk of breast cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*, 190:40-42, 2009.