

Aspectos genómicos, transcriptómicos y del diagnóstico en el síndrome de Down

Genomic, transcriptomic, and diagnostic features of Down syndrome

David J. Díaz-Hernández¹, Isaura P. Torres-Gómez², Adriana M. Arango-Martínez³, Rubén D. Manrique-Hernández⁴, Juan E. Gallo-Bonilla⁵

Resumen. *El síndrome de Down es causado por la presencia de una tercera copia del cromosoma 21 y fue descrito por primera vez en 1838 por Jean-Etienne-Dominique, y más tarde por John Langdon Haydon Down en 1866, mientras trabajaba como superintendente médico en el Asilo Real de Earlswood. Desde ese momento, la comunidad científica puso grandes esfuerzos en tratar de elucidar diversos aspectos que influyen en la naturaleza de esta condición, y que determinan su incidencia y factores de riesgo. De igual manera, se ha puesto interés en los genes involucrados en esta enfermedad, la relación genotipo-fenotipo, la expresión del fenotipo, la variabilidad del material genético y las consecuencias transcripcionales que se producen al tener una tercera copia, ya sea parcial o total, del cromosoma 21. Además, se han invertido esfuerzos en identificar biomarcadores y en diseñar metodologías de diagnóstico prenatal no invasivo que sean altamente eficientes para un mejor diagnóstico del síndrome de Down, y así reducir su impacto negativo en las madres gestantes, al proveerlas de información neutral y precisa acerca de vivir con un hijo con síndrome de Down, y darles autonomía en la decisión de la continuación de su embarazo.*

Palabras clave: *cromosoma 21, trisomía 21, síndrome de Down, genotipo, fenotipo, ADN libre de células.*

¹ Biólogo, Investigador GenomaCES, Universidad CES. Medellín, Colombia.

² Bacterióloga, MSc y PhD en Biología. Coordinadora de Laboratorio, GenomaCES, Universidad CES. Medellín, Colombia. E-mail: itorres@ces.edu.co.

³ Médica, Especialista en Ginecología y Obstetricia, MSc en Epidemiología, MSc en Reproducción. Subgerente, Dejando Huella Fertilidad. Medellín, Colombia.

⁴ Químico Farmacéutico, MSc y PhD en Epidemiología. Director de Investigación e Innovación, Universidad CES. Medellín, Colombia.

⁵ Biotecnólogo, Biólogo Molecular y Microbiólogo, PhD en Ciencias Biomédicas. Director Científico, GenomaCES, Universidad CES. Medellín, Colombia.

Conflicto de interés: los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Medicina & Laboratorio 2020;24:37-56. <https://doi.org/10.36384/01232576.13>

Recibido el 23 de julio de 2018; aceptado el 19 de enero de 2019. Editora Médica Colombiana S. A., 2020[®].

Abstract. Down syndrome is caused by the presence of a third copy of chromosome 21 and was first described by Jean-Etienne-Dominique in 1838, and later by John Langdon Haydon Down in 1866, while working as a medical superintendent in the Royal Earlswood Asylum. Since, the scientific community has placed great efforts in trying to elucidate different influencing features in the nature of this condition that determine their incidence and risk factors. In addition, especial attention has been given to the genes involved in this disease, the genotype-phenotype relationship, the expression of the phenotype, the variability of the genetic material and the transcriptional consequences that are produced by having a third copy, either partial or total, of chromosome 21. Additionally, efforts have been invested in identifying biomarkers and designing noninvasive prenatal methodologies that are highly efficient for a better diagnosis of Down syndrome, in order to reduce its negative impact in pregnant mothers, by providing them with neutral and accurate information about life with a child with Down syndrome, as well as providing the autonomy in the decision to continue their pregnancy.

Key words: Chromosome 21, trisomy 21, Down syndrome, genotype, phenotype, cell free DNA.

Introducción

Dentro de las múltiples aberraciones cromosómicas de naturaleza numérica, el síndrome de Down o trisomía del cromosoma 21 es el más común, con una incidencia que varía entre 1 en 700 y 1 en 1.000 recién nacidos. Las primeras descripciones de este síndrome fueron hechas por Jean-Etienne-Dominique en 1838, y por Édouard Séguin en 1846. Luego, en 1866, John Langdon Haydon Down, mientras trabajaba como superintendente médico en el Asilo Real de Earlswood (Inglaterra), identificó, en algunos de los pacientes que atendía con discapacidad mental, cierta forma de retraso mental que fue nombrada como "*mongolian idiocy*" (idiotéz mongoliana) por el parecido fenotípico que presentaban los pacientes con los pobladores de los grupos étnicos mongoles [1].

Años más tarde, en 1961, un grupo de genetistas envió a la revista *Lancet* un comunicado en el que sugerían cuatro

denominaciones alternativas para este trastorno: anomalía Langdon Down, síndrome de Down, trisomía 21 y acromicria congénita, el cual fue definido, finalmente, como síndrome de Down [1,2], término que fue avalado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) casi cien años después de las primeras descripciones [1].

Los pacientes con síndrome de Down se enfrentan a varias complicaciones de salud, entre ellas dificultades en el aprendizaje y la memoria, enfermedades cardíacas congénitas, enfermedad de Alzheimer, leucemia, cáncer y enfermedad de Hirschsprung [3]. Este trastorno es usualmente causado por una tercera copia, o trisomía, del cromosoma 21; término con el que también se conoce este síndrome. En el 95% de los casos el síndrome es causado por la presencia de un tercer cromosoma 21 completo, mientras que en el 3% al 5% de los casos la presencia de este puede ser parcial, lo que significa que es causado solo por una porción extra

del cromosoma 21. Finalmente, máximo en el 2% se presenta en forma de mosaicismo, en el cual solo algunas células presentan la trisomía 21 [4].

Los factores de riesgo involucrados en la incidencia del síndrome de Down son diversos y pueden ser de tipo químico, inmunológico o genético; entre los más relevantes se encuentran: a) la exposición del feto a radiación ionizante, por ejemplo, cuando la madre es sometida a rayos X con fines terapéuticos o médicos; b) la no disyunción durante la etapa de meiosis, ya sea en el óvulo o el espermatozoide y, la más importante, c) la edad de la madre, ya que si es muy avanzada puede incrementar la frecuencia de aparición de esta alteración [4].

En el síndrome de Down son varios los genes que se encuentran relacionados con las características fenotípicas del mismo, los cuales se encuentran, en su mayoría, en una región dentro del cromosoma 21 conocida como región crítica del síndrome de Down (*DSCR*, del inglés, *Down Syndrome Critical Region*) [5]. La presencia de una copia extra de estos genes lleva a un incremento en los niveles de la proteína β -amiloide en el cerebro del paciente, que causa una demencia parecida al Alzheimer [6], al igual que un acortamiento en la longitud de los axones o un cambio en la frecuencia a la cual operan las neuronas, lo que causa retraso mental en diferentes grados; en otros casos, puede causar una no disyunción al momento de la segregación de los cromosomas [6-8].

Con base en lo anterior, el propósito de esta revisión es brindar información más amplia acerca de diversos aspectos del síndrome de Down, como sus características genómicas, sus perfiles transcripcionales y las estrategias

disponibles para su diagnóstico, tales como el cariotipo, los métodos de secuenciación de nueva generación y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*), entre otras [6].

Factores de riesgo del síndrome de Down

El síndrome de Down es de naturaleza multifactorial, por lo cual la suma de muchos factores causa un desbalance en la carga de cromosomas causantes de este síndrome que, por lo general, es el resultado de la no disyunción o falla en la separación de los cromosomas homólogos durante la etapa de meiosis, ya sea en el óvulo o en el espermatozoide [9]. Con menor frecuencia, el síndrome de Down resulta de translocaciones robertsonianas o mosaicismo (formado por una línea celular normal y una línea celular con la trisomía) [5].

Los factores de riesgo del síndrome de Down son agrupados en dos categorías: los ambientales y los fisiológicos. Entre los factores ambientales se incluyen las exposiciones a tóxicos ambientales, sustancias químicas como toxinas y otros compuestos químicos, el uso de fármacos para el tratamiento de enfermedades psicológicas y el uso descontrolado de anticonceptivos orales, hormonales o espermicidas, los cuales pueden causar cambios en el sistema reproductor femenino que favorecen la aparición del síndrome de Down [9].

Entre los factores de riesgo fisiológicos, la edad de la madre es el más importante para la aparición del síndrome, debido a que aumenta el riesgo de formación de aneuploidías en los ovocitos, probablemente por la mayor susceptibilidad de los óvulos a

los efectos del envejecimiento y a la acumulación de sustancias tóxicas que pueden, a futuro, causar una trisomía, en comparación con los espermatozoides que presentan un recambio celular de manera cíclica. En otros casos, si la madre fue concebida a una edad avanzada, puede aumentar la probabilidad de dar origen a una prole con síndrome de Down, debido a que los ovarios de la abuela podrían no tener éxito en la producción de las proteínas asociadas al huso mitótico acromático, que son los factores responsables del reposo del oocito, de las proteínas que se unen al quiasma y de las enzimas de reparación del ADN, entre otros factores que se requieren para una segregación meiótica correcta en las células germinales de la madre, lo que desencadenaría en ella, posteriormente, la concepción de un feto con presencia de una trisomía 21 [9].

Genes relacionados con el síndrome de Down

El cromosoma 21 es uno de los 23 cromosomas del ser humano. Posee un tamaño aproximado de 48 Mb y su información se encuentra distribuida alrededor de 33,5 Mb en el brazo largo q21, y entre 5 Mb y 15 Mb en el brazo corto p21. Este cromosoma alberga cerca de 400 genes, varios de los cuales están vinculados con la variedad de complicaciones clínicas y rasgos fenotípicos que se observan en el síndrome de Down. La mayoría de estos genes están ubicados en la región cromosómica DSCR, con una longitud aproximada de 5,4 Mb extendida entre 21q22.11 y 21q22.3 [10] (**figura 1**).

El gen *RUNX1* es uno de los genes que más se ha relacionado con diver-

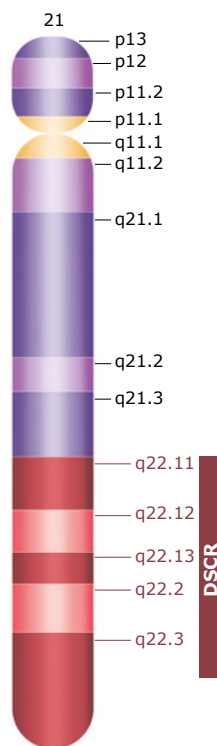


Figura 1. Representación del cromosoma 21 humano y ubicación de la región DSCR asociada con síndrome de Down.

sos tipos de leucemia, debido a que se ubica en el punto de inflexión de la translocación entre los cromosomas 8 y 21 [t(8;21)]; alteración que se ha reportado frecuentemente involucrada en el desarrollo de la leucemia mieloide aguda [10]. La implicación del incremento en la carga génica de *RUNX1* y el desarrollo de leucemia están bastante destacados en la relación síndrome de Down-leucemia. En esta relación también participan otros genes que no se encuentran en el cromosoma 21, como el *GATA1*, localizado en el cromosoma X, el cual codifica para la proteína de unión a GATA-1, un importante regulador transcripcional de la diferenciación megacariocítica normal, cuyas mutaciones pueden ocasionar leucemia megacarioblástica [11].

Contrariamente, los tumores sólidos son poco frecuentes o raros en niños y adultos con síndrome de Down, lo cual se ha atribuido al aumento en la expresión de genes localizados en el cromosoma 21 [12], como el *ETS2*, que codifica para el protooncogén ETS-2, un factor de transcripción que regula genes implicados en el desarrollo celular y la apoptosis [13], y el *RCAN1*, también llamado *DSCR1*, que codifica para la proteína reguladora de la calcineurina-1, que interactúa con la calcineurina A para inhibir la señalización angiogénica mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por la vía de esta enzima [14], lo cual suprime el crecimiento y la angiogénesis tumoral y confiere un efecto protector sobre este tipo de malignidades.

No obstante, se ha descrito que los genes *ETS2* y *RCAN1* también están implicados en algunas manifestaciones del síndrome de Down. El *ETS2* es considerado un gen candidato de leucemia megacarioblástica, y su sobreexpresión ha sido relacionado con las alteraciones esqueléticas características de este trastorno [11]. De igual manera, el aumento en la dosis génica de *RCAN1* puede acortar la longitud de los axones, lo que lleva a condiciones de retraso mental en el síndrome de Down [7]. La sobreexpresión de *RCAN1* puede incrementar el riesgo de desarrollar Alzheimer prematuro, debido probablemente, al exceso en la síntesis de la proteína precursora amiloidea que se asocia con esta enfermedad, producto de la sobreexpresión del gen *APP*, que también se localiza en el cromosoma 21. Esto conduce al incremento y acumulación de la proteína β -amiloide en el cerebro, que produce efectos tó-

xicos sobre las neuronas y, en consecuencia, la demencia que se encuentra en el síndrome de Down [6].

Entre otros hallazgos clínicos relacionados con el exceso en la expresión de *RCAN1* se registran valores bajos en la presión sistólica y diastólica en los individuos con síndrome de Down, respecto a los individuos que no lo padecen, debido al efecto de la proteína en el desarrollo de las neuronas del sistema nervioso simpático [7].

PCNT, que codifica para la pericentrina, es otro gen en el cual sus alteraciones genéticas se asocian con un tipo de enanismo primordial, retraso del crecimiento intrauterino, cardiomiopatía y diabetes tipo 2 [15]. Por su parte, el gen *DSCAM*, que codifica para moléculas de adhesión celular de la familia de las inmunoglobulinas (Ig-CAM) en las células neuronales, está implicado en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico humano, y su sobreexpresión durante el desarrollo fetal se ha descrito que conduce al síndrome de Down [5]. El gen *DYRK1A* codifica para una quinasa importante en la formación y maduración de las espinas dendríticas, y su sobreexpresión ha sido reportada como causante de una alteración en la frecuencia de la operación neuronal [5,7].

En la **tabla 1** se resumen las funciones de los genes que se destacan por su relación con el síndrome de Down, al igual que el efecto de cada uno de ellos en el fenotipo de los individuos afectados producto de la trisomía 21.

Expresión genotípica en el síndrome de Down

La sobreexpresión de los genes que codifican para proteínas y ARN no co-

Tabla 1. Genes involucrados en el fenotipo del síndrome de Down

Nombre abreviado del gen	Nombre completo del gen	Localización génica	Función del gen en estado nativo	Efectos en el fenotipo del síndrome de Down
APP	Proteína precursora amiloidea	21 q21.3	Codifica para un receptor de superficie celular y para una proteína precursora transmembranal, que es escindida para formar diversos péptidos para la activación transcripcional y con función antimicrobiana	Aunque no se encuentra dentro de la región DSCR, este gen es el causante de la demencia observada tanto en la enfermedad de Alzheimer como en el síndrome de Down, producto de la acumulación en cerebro de péptidos derivados de la proteína precursora
CBS	Cistationina-beta-sintasa	21 q22.3	Codifica para un homotetrámero que cataliza la conversión de homocisteína a cistationina	Puede ser letal tras el parto
CLDN14	Claudina 14	21 q22.13	Codifica para una proteína integral de membrana y componente de las cadenas de uniones estrechas (forma de adhesión célula-célula)	_____
DSCAM	Molécula de adhesión celular del síndrome de Down	21 q22.2	Codifica para proteínas que pertenecen a la superfamilia de moléculas de adhesión celular de la familia de las inmunoglobulinas (Ig-CAM) en las células neuronales, involucradas en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico de los humanos	Es uno de los genes candidatos para ocasionar síndrome de Down y enfermedad cardíaca congénita
RCAN1/DSCR1	Regulador de la calcineurina-1	21 q22.12	Codifica para una proteína que interactúa con la calcineurina A para inhibir las vías de señalización dependientes de la calcineurina, lo que puede, posiblemente, afectar el desarrollo del sistema nervioso central	Se sobreexpresa en el cerebro de los fetos con síndrome de Down, lo que puede causar problemas en el desarrollo del sistema nervioso central, como acortamiento en la longitud de los axones. La sobreexpresión crónica conduce a la formación de ovillos neurofibrilares como los asociados con la enfermedad de Alzheimer

DYRK1A	Quinasa de doble especificidad regulada por fosforilación en tirosina-1A	21 q22.13	Codifica para una enzima quinasa, importante en el desarrollo del sistema nervioso, involucrada en la formación y maduración de las espinas dendríticas	La sobreexpresión de este gen puede causar complicaciones en el desarrollo del sistema nervioso, como la alteración de la frecuencia a la cual operan las neuronas
ETS2	Protooncógen 2, factor de transcripción	21 q22.2	Codifica para un factor de transcripción que regula genes implicados en el desarrollo celular y la apoptosis, y que es también un protooncógen	La proteína codificada cumple funciones en los procesos de supresión tumoral, lo cual puede explicar la baja incidencia de tumores en el síndrome de Down
HLCS	Holocarboxilasa sintetasa	21 q22.13	Codifica para una enzima que cataliza la unión de biotina a carboxilasas e histonas. La proteína desempeña un papel importante en la gluconeogénesis, la síntesis de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	_____
KCNE1	Subunidad 1 reguladora de la subfamilia E de los canales de potasio dependiente de voltaje	21 q22.12	Codifican para proteínas de membrana pertenecientes a la familia KCNE de canales de potasio activados por voltaje, esenciales para muchas funciones celulares que incluyen la regulación de la liberación de neurotransmisores, la frecuencia cardíaca y la excitabilidad neuronal, entre otros	_____
KCNE2	Subunidad 2 reguladora de la subfamilia E de los canales de potasio dependiente de voltaje	21 q22.11		
PCNT	Pericentrina	21 q22.3	Codifica para una proteína integral del material pericentriolar que se une a la calmodulina, se expresa en el centrosoma y participa en la regulación del ciclo celular	Conduce a enanismo y problemas al momento de la disyunción cromosómica

S100B	Proteína B de unión al calcio S100	21q22.3	Codifica para una proteína que pertenece a la familia de proteínas de unión S100, localizadas en el citoplasma y en el núcleo de varios tipos celulares y se encargan de regular la progresión del ciclo y la diferenciación celular	Contribuye al estrés oxidativo y la apoptosis en progenitores neuronales humanos en el síndrome de Down
SIM2	Factor de transcripción 2 SIM bHLH	21q22.13	Codifica para un factor de transcripción importante en la regulación de la neurogénesis	Vinculado con varios rasgos fenotípicos del síndrome de Down, como los hallazgos neurológicos e incremento en el riesgo de leucemia
RUNX1	Factor de transcripción relacionado con RUNT-1	21q22.12	Codifica para la subunidad alfa del factor de unión al núcleo (CBF), un factor de transcripción heterodimérico que se une al elemento central de muchos potenciadores y promotores. Se cree que está involucrada en el desarrollo de la hematopoyesis normal	Este gen tiene una relación estrecha con la formación de diversos tipos de leucemia, debido a que se encuentra en un punto de inflexión de la translocación entre el cromosoma 21 y el 8 [t(8;21)]. Un aumento en la carga genética de este gen tiene grandes repercusiones en la relación síndrome de Down-leucemia, ya que las personas con este síndrome tienen una mayor probabilidad de desarrollar leucemia
GATA1	Proteína de unión a GATA1	Xp11.23	Codifica para una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción GATA y desempeña un papel importante en el desarrollo de los eritrocitos y megacariocitos	Aunque está ubicado en el cromosoma X las mutaciones en este gen se han relacionado con los procesos de generación de leucemia megacarioblástica dentro del genotipo del síndrome de Down

Información tomada y adaptada de Gene, National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine. Consultado febrero 2018.
 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term>.

dificantes localizados en el cromosoma 21, debida al material cromosómico adicional que se produce cuando se encuentra en estado de trisomía, es probable que pueda alterar varias funciones celulares y procesos de desarrollo que dan lugar a una perturbación global de los procesos normales de transcripción, independientemente de su contenido génico o repertorio regulatorio. Por tal razón, es importante el estudio de los perfiles transcripcionales de las células normales y las que tienen trisomía 21.

Los estudios revisados por Antonarakis y colaboradores en 2017, mostraron que los compartimentos nucleares de las células con trisomía 21 experimentan modificaciones en la cromatina que influyen en el transcriptoma global y que, por lo tanto, producen cambios en la expresión de los dominios génicos disregulados (GEDD) que pueden contribuir a algunos fenotipos del síndrome de Down [16]. Por su parte, la evaluación de transcritos expresados en muestras de cerebros de personas con y sin síndrome de Down, realizada por Olmos-Serrano y colaboradores en 2016, proporcionó un análisis más completo de la expresión génica, que elucidó procesos claves en diferentes niveles de expresión, entre ambas poblaciones; además, demostró anomalías importantes en la expresión de genes asociados con el desarrollo de oligodendrocitos y mielinización [17].

Prandini y colaboradores 2007 categorizaron los genes del cromosoma 21 según el grado de superposición de la expresión génica en células de individuos con trisomía 21 y euploides, el cual fue medido mediante una

prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para esto dividieron los genes del cromosoma 21 en tres grupos: el grupo A, correspondiente a los que tuvieron un grado mínimo de solapamiento y una gran sensibilidad a la dosis génica; el grupo B, conformado por aquellos con un grado de solapamiento moderado, y el grupo C, por los que presentaban un alto grado de solapamiento. El análisis permitió establecer que los genes del grupo A eran los candidatos más probables para algunos de los fenotipos del síndrome de Down, como el retraso mental, la hipotonía muscular y la enfermedad de Alzheimer, los cuales se hallaron en todas las personas afectadas. Según este estudio, estas condiciones se pueden deber a los altos niveles de expresión de estos genes en los individuos con el síndrome, en comparación con los controles [18].

En otro estudio, realizado por Lim y colaboradores en 2016, en el que evaluaron la expresión de varios genes del cromosoma 21 en placentas de fetos, tanto con trisomía 21 como no afectados, se observaron niveles incrementados en aquellas de los fetos con síndrome de Down, debido probablemente, a la hipometilación encontrada en las regiones intragénicas de los genes estudiados, la cual puede generar la sobreexpresión. Además, se demostró que estos genes estaban asociados con ciertas alteraciones presentes en la trisomía 21, tales como retraso mental, manifestaciones neuroconductuales y alteraciones congénitas [19].

Relación fenotipo-genotipo en el síndrome de Down

Durante la celebración de los cincuenta años del descubrimiento del síndrome

de Down, Megarbane y colaboradores, en su artículo publicado en el 2009, resaltaron la correlación genotipo-fenotipo de este trastorno, enunciando varias investigaciones en las que evaluaron diferentes genes del cromosoma 21 implicados en la aparición de diversas complicaciones relacionadas con el síndrome de Down, que se encontraban agrupados en la región DSCR [20].

Según describen los autores, anteriormente existían otras definiciones para la región DSCR, hasta 1997 cuando finalmente, en una reunión del laboratorio Cold Spring Harbor se aprobó una nomenclatura común, en la que se definió a DSCR-1 como la región con el mayor número de características asociadas al síndrome de Down, incluidos los fenotipos faciales, el aspecto de las manos y el retraso mental. Por otro lado, los autores indican que la trisomía 21 se relaciona con el desbalance en la dosis génica de otros genes como *CAF1A*, *CBS* y *GART*, lo que podría afectar la síntesis y reparación del ADN. Además, que la sobreexpresión de *COL6A1* puede causar defectos cardíacos y la de *DYRK1A* un cambio en la frecuencia de operación de las neuronas, así como retraso mental, mientras que la sobreexpresión de *ETS2* puede ser la causa de leucemia, específicamente la megacarioblástica, y alteraciones esqueléticas [20].

Se han formulado varias hipótesis que explican la correlación entre el genotipo y el fenotipo del síndrome de Down. La primera es la del desequilibrio de la dosis génica en el estado de la trisomía 21, lo cual se fundamenta en la dosis aumentada del número de copias de los genes en el cromosoma 21 [21]. Luego, esta idea fue ampliada para incluir la posibilidad de que genes espe-

cíficos, o subconjuntos de estos, pueden controlar los fenotipos específicos del síndrome de Down. La segunda hipótesis propone que esta relación está basada en una inestabilidad del desarrollo amplificada, que indica la existencia de una dosificación no específica de una serie de genes trisómicos, que conduce a un desequilibrio genético causante de un gran impacto en la expresión y regulación de muchos genes a lo largo del genoma [22].

Por último, está la hipótesis de la ya mencionada región DSCR, en la cual se dice que las regiones candidatas causantes del síndrome de Down están concentradas en una porción específica del cromosoma 21 [23-25]. No obstante, esta fue discutida en 2007 por Olson y colaboradores, quienes afirman que la región crítica del cromosoma 21 ya no es la única causa para que se den las manifestaciones de la enfermedad. En su trabajo realizado en modelos de ratones se observaron dos grupos, ambos con trisomía parcial del cromosoma 21. Uno de los grupos, que en la tercera copia contenía todos los genes propios del cromosoma 21, incluyendo la región DSCR, presentó un fenotipo compatible con el síndrome de Down, mientras que el otro, en el cual la tercera copia del cromosoma 21 tenía representada la región DSCR, pero no los demás genes del cromosoma 21, no presentó dicho fenotipo. Esto llevó a los autores a plantear que los fenotipos no son consecuencia de la triple presencia de un único gen o grupo de genes, sino de la relación que sucede entre ellos. Además, que la sobreexpresión de un gen puede desempeñar un papel prioritario en los rasgos del fenotipo característico de la

enfermedad, pero siempre se verá modulada por la acción excesiva de otros genes del cromosoma 21 [25].

Por su parte, Pelleri y colaboradores en 2017 reportaron la presencia de una región crítica del cromosoma 21, muy relacionada con enfermedades cardíacas congénitas, como las anomalías del canal atrioventricular, lo que mostró una perspectiva muy interesante de la correlación del genotipo-fenotipo [26].

Consecuencias transcripcionales en la trisomía 21

En 2002, FitzPatrick propuso un modelo que permitiera el entendimiento de las consecuencias de la transcripción en la trisomía 21, en el cual plantea que una copia adicional de los genes localizados en el cromosoma 21 daría como resultado un aumento de 1,5 veces en la expresión de muchos de ellos, y que algunos de estos pueden causar un cambio en el fenotipo que produce varias de las características más comunes en el síndrome de Down. Según el modelo, la sobreexpresión de los genes del cromosoma 21, que codifican para los factores trans-reguladores, pueden inducir una regulación inapropiada de los genes disómicos (genes que no están en el cromosoma 21), lo que indica que la trisomía del cromosoma 21 no solo influye sobre los productos derivados directamente de sus propios genes, sino que modifica el comportamiento de genes de otros cromosomas. Por lo tanto, los efectos de la dosis génica primaria, así como de los factores trans-reguladores, producen un efecto en el fenotipo que podría resultar en una aparente mala regulación terciaria de los genes disómicos [27].

Este modelo fue previamente abordado por Chrast y colaboradores en 2000, en su estudio sobre el transcriptoma del cerebro del ratón, que dio pasos importantes en el entendimiento del modo en el que se expresan los genes y la inducción de enfermedades [28]. Asimismo, Mao y colaboradores en 2005 detectaron cambios específicos en la expresión génica, tanto en los tejidos como en las células en estado de trisomía 21 durante el desarrollo fetal, donde el análisis estadístico de los grupos de genes funcionales estudiados por microarreglos proporcionaron indicios de posibles vías biológicas afectadas por la trisomía 21 [29].

Variabilidad en el material genético en la trisomía 21

La variabilidad del material genético del cromosoma 21 podría ser parcialmente responsable de los diferentes fenotipos del síndrome de Down, lo que hace necesario determinar las variantes de ADN comunes y raras en este cromosoma. Aproximadamente, el 1,26% del cromosoma 21 está compuesto por secuencias de repeticiones cortas que pueden ser polimórficas, entre las cuales se han identificado 105.334 polimorfismos de nucleótido simple (SNP, del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) probables en este cromosoma [30].

En una evaluación inicial hecha por Thomas y colaboradores en 2003, en la que utilizaron la propiedad de desequilibrio de ligamiento del material genético, encontraron un total de 24.386 polimorfismos de nucleótido simple e identificaron y describieron el ancho de los mapas cromosómicos, lo que proporcionó la información de la infraestructura genómica para la de-

terminación de los polimorfismos de nucleótido simple, involucrados en la variación de la expresión génica y en la predisposición a presentar diferentes manifestaciones fenotípicas del síndrome de Down, incluyendo fenotipos complejos y comunes [30].

En una revisión realizada por Antonarakis en 2006, se menciona que casi todos los aspectos del fenotipo del síndrome de Down están sujetos a un alto grado de variabilidad, lo que lleva a que ninguna de las características dismórficas menores se encuentre en más del 80% de la población con síndrome de Down; además, que es poco probable que dos personas con trisomía 21 tengan exactamente la misma combinación de características. Otro punto importante en esta revisión es la indicación de que los tres alelos presentes en los pacientes con trisomía 21 deben reflejar un umbral de expresión para poder causar una repercusión en el fenotipo del síndrome de Down [31].

Biomarcadores para el diagnóstico prenatal no invasivo

ADN fetal libre de células

El material genético del feto libre en el plasma de la madre, mejor conocido como ADN fetal libre de células (cffDNA, del inglés, *cell-free fetal DNA*), fue descrito por primera vez en 1850. No obstante, fue hasta 1997 que Lo y colaboradores, luego de identificar secuencias de ADN del cromosoma Y en el suero materno, postularon que podía ser utilizado como un biomarcador [32]. Este hallazgo sirvió de base para que el ADN fetal libre de células fuera utilizado en otros estudios para la detección de diversas complicaciones

que podrían afectar tanto la calidad de vida del feto como de la madre. Por ejemplo, Lo y colaboradores en el año 2000 encontraron que las mujeres con preeclampsia tenían cinco veces más concentración de ADN fetal libre de células en comparación con las mujeres sin esta afección [33].

Años más tarde, Sifakis y colaboradores en 2009, reportaron que este aumento se podía encontrar durante las primeras etapas del embarazo en las mujeres que estaban destinadas a padecer preeclampsia [34]. No obstante, según lo revisado por Sifakis y colaboradores en 2015, Crowley y colaboradores en 2007 no encontraron diferencias significativas entre dichos niveles [35].

Otra aplicación del ADN fetal libre de células en mujeres embarazadas es la detección del grupo sanguíneo RhD, el cual es uno de los más polimórficos en la sangre de los humanos [34], ya que una genotipificación temprana del feto puede evitar problemas como la enfermedad hemolítica del recién nacido, en la cual la madre produce anticuerpos que atacan los glóbulos rojos del feto [36].

Estas y otras aplicaciones, dieron origen al desarrollo de las metodologías de diagnóstico prenatal no invasivas (NIPT, del inglés, *Non-Invasive Prenatal Testing*) con las que se cuenta actualmente. Poco después de su implementación, se observó un avance en las metodologías de secuenciación que dieron origen a métodos de mayor impacto en el campo, como la secuencia masiva paralela (MPS, del inglés, *Massive Parallel Sequence*), o secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés, *New Generation Sequencing*), y la inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP, del inglés, *Methylated DNA*

Immunoprecipitation), usadas en combinación con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, las cuales permitieron secuenciar de manera más rápida, eficiente y con capacidad mejorada, fragmentos de ADN de mayor tamaño localizados en regiones de interés específicas, como los cromosomas 13, 18 y 21 [37,38].

Estas tecnologías, en combinación con el uso del ADN fetal libre de células, permitieron identificar y cuantificar los cambios en la cantidad del ADN cromosómico fetal que determinan la presencia de aneuploidías, el sexo del feto o su RhD. Sin embargo, el ADN fetal libre de células representa solo una fracción del ADN total extraído, el cual puede variar por múltiples factores y, de acuerdo con la metodología que se utilice para el diagnóstico, requiere que se incluya una técnica que ayude a separar el ADN fetal del ADN materno [37-39].

Es así como el ADN fetal libre de células constituye una nueva alternativa respecto a las metodologías tradicionales para el diagnóstico prenatal, como la amniocentesis y la biopsia de vellosidades coriónicas, que son altamente invasivas para el feto y pueden ser causales de aborto; no obstante, su uso aún está sujeto a ciertas complicaciones, como el mosaicismo en la placenta, el cual ocurre cuando la placenta presenta aneuploidías pero el feto está en condiciones euploides, lo que provoca un diagnóstico errado [37-39], y los casos en que la madre presenta: a) una aneuploidía no diagnosticada, siendo la más común el mosaico materno 45,X/46,XX o 47,XXX; b) un diagnóstico de cáncer, ya que las células y el material genético tumoral que está libre en sangre periférica puede dar como resultado un falso positivo, y c)

sobrepeso, el cual puede aumentar la fracción de ADN fetal libre de células presente en su sangre, lo que altera la efectividad en el tamizaje [40].

Regiones diferencialmente metiladas

Las regiones diferencialmente metiladas son segmentos genómicos con diferentes estados de metilación entre múltiples muestras (tejidos, células, individuos u otros) que se comparan, los cuales intervienen en la regulación transcripcional de genes. En 2009, Pappageorgiou y colaboradores [41] buscaron estas regiones en el ADN de sangre de mujeres no embarazadas y en el ADN de placentas de mujeres en el primer o el tercer trimestre de gestación. Para esto utilizaron la técnica de inmunoprecipitación de ADN metilado, en la que el material genético es inmunoprecipitado usando un anticuerpo específico para sitios CG metilados, en dos experimentos independientes. Luego, las regiones hipermetiladas aisladas y las no hipermetiladas (ADN no inmunoprecipitado) se cohibridaron en un oligoarreglo de alta resolución de los cromosomas 13, 18, 21, X y Y para identificar las regiones diferencialmente metiladas en el ADN de ambas muestras y calcular la diferencia de la metilación entre ellas.

Como resultado de este estudio se identificaron más de 10.000 regiones diferencialmente metiladas candidatas, de las cuales alrededor de 2.000 se ubicaban en el cromosoma 21. Entre estas, los autores seleccionaron 12 regiones que se encontraban hipometiladas en el ADN de sangre periférica de las mujeres no embarazadas, pero hipermetiladas en las placentas, las cua-

les fueron confirmadas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, lo que permitió establecer una relación diferencial de la metilación en este cromosoma [42].

Con base en estos hallazgos, Papa-georgiou y sus colaboradores en 2011 realizaron la identificación de regiones diferencialmente metiladas en el cromosoma 21, a partir de muestras de ADN fetal en sangre periférica materna, utilizando el protocolo de inmunoprecipitación ya descrito por ellos, en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, a través de la cual fue posible cuantificar estas regiones y medir la relación de la metilación del ADN específico del feto entre una muestra desconocida, con o sin síndrome de Down, y la mediana de muestras normales conocidas. Así, el hallazgo de la diferencia en la proporción de ADN fetal metilado entre los embarazos normales y con trisomía 21 permitió el desarrollo de una nueva metodología de diagnóstico no invasivo del síndrome de Down, con una alta especificidad y sensibilidad [43].

Micro-ARN

Los micro-ARN (miRNAs, del inglés, *microRNA*) son una clase pequeña de ARN, de aproximadamente 22 nucleótidos, que desempeñan un papel importante en la regulación postranscripcional y en diversas enfermedades del ser humano. Como dato interesante se ha demostrado que los micro-ARN son altamente estables en la sangre total, lo que los hace candidatos ideales para el uso de las herramientas de diagnóstico no invasivo [44]. Algunos estudios encontraron que la función de los micro-ARN en la regulación de

la proliferación y el desarrollo celular mejora el entendimiento acerca de la progresión de diferentes fenotipos propios del síndrome de Down. Es así como el micro-ARN miR-1246, identificado como objeto transcripcional de p53 se encuentra involucrado en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia [45].

Por su parte miR-155 y miR-802 en niveles altos se han relacionado con afecciones del hipocampo, cuya función es controlar el aprendizaje y la memoria. De igual forma, la sobreexpresión de miR-155, que regula la transcripción del receptor de angiotensina II tipo 1, lleva a una baja expresión de este, lo que puede explicar la ausencia de enfermedad cardiovascular en los individuos con síndrome de Down [46]. Por otro lado, el grupo miR-99a/let-7c causa defectos cardíacos congénitos, mientras que miR-125b-2, miR-155 y miR-99, posiblemente, desempeñan funciones en la patogénesis de la leucemia megacarioblástica en pacientes con síndrome de Down [44,46].

Kamhieh-Milz y colaboradores en 2014 utilizaron micro-ARN extracelulares presentes en plasma materno para el diagnóstico prenatal no invasivo de síndrome de Down, mediante el uso de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de alto rendimiento (PCR-HT-qPCR, del inglés, *High Throughput Quantitative PCR*), donde encontraron 36 de ellos expresados diferencialmente en los embarazos con trisomía 21, respecto a los euploides [44]. Aunque hasta la fecha no se conocen muy bien los mecanismos involucrados en el transporte de los micro-ARN al plasma de la madre, estos, a diferencia del ADN fetal libre

de células, que proviene de la placenta, vienen directamente del feto, lo que los hace más específicos y un reflejo más real de lo que sucede en el feto en gestación. Además, el uso de estos marcadores para el diagnóstico de la trisomía 21 resulta ser de bajo costo, alta eficiencia y con gran potencial para su aplicación como prueba para el tamizaje del síndrome de Down [46].

Regiones cortas de repetición en tándem y regiones interdispersas

Las regiones cortas de repetición en tándem (STR, del inglés, *Short Tandem Repeat*) y las regiones interdispersas, son zonas altamente repetitivas que se pueden hallar en los genomas y ser utilizadas para el diagnóstico del síndrome de Down. Las metodologías que se usan para el estudio de estos marcadores son la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para duplicaciones segmentarias en combinación con la secuenciación de Sanger [47,48].

Los segmentos duplicados corresponden a fragmentos de ADN que poseen secuencias idénticas (90% al 100%), y se ubican en múltiples localizaciones en el genoma como resultado de eventos de duplicación. El diagnóstico de la trisomía 21, según este tipo de marcadores, se basa en la relación establecida entre las unidades de fluorescencia de las muestras analizadas representada en forma de picos. Es así como las regiones cortas de repetición en tándem producen una intensidad de fluorescencia de 1:1:1 o de 2:1 para una trisomía y una relación de 1 o 1:1 en los casos de fetos no afectados. Algunos de los marcadores usados para

este tipo de diagnóstico más informativos son el DS21S11, el DS21S1141 y el DS21S1270 [47,49-52].

Por otro lado, para la identificación de las regiones interdispersas, se usa un segmento dentro del cromosoma 21 que tenga una secuencia homóloga en otro lado del genoma, como es el caso del SD7QF21 en el cromosoma 21 y su homólogo en el cromosoma 2. Esto hace que a la hora del diagnóstico, la relación de fluorescencia sea 2:2 para un paciente no afectado y una relación 3:2 para un paciente con trisomía 21. La ventaja que presenta esta metodología es que puede ser de bajo costo, rápida y sencilla a la hora de su implementación como prueba de tamizaje; no obstante, su especificidad y sensibilidad pueden ser más bajas que las pruebas que usan otros marcadores genéticos [48].

Técnicas para el diagnóstico del síndrome de Down

El advenimiento de la biología molecular y los avances en la citogenética han permitido el desarrollo y la aplicación de herramientas diagnósticas que facilitan la determinación de la trisomía 21. A continuación se describen algunas de estas técnicas, nombrando las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

El cariotipo

Actualmente son muchos los métodos que se usan para la detección del síndrome de Down, pero el cariotipo es hasta el día de hoy el estándar de referencia para la detección no solo del síndrome de Down, sino también de diversas aberraciones cromosómicas de carácter numérico, como son las trisomías de los cromosomas somáticos

13, 18, 21, X y Y, así como alteraciones estructurales del tipo inserciones y deleciones [3].

Esta técnica requiere para su aplicación en el diagnóstico prenatal, la toma de muestras de líquido amniótico mediante amniocentesis en la semana 14 de gestación, o de vellosidades coriónicas en la semana 11, ambas guiadas por ecografía, seguida del cultivo de las células obtenidas. Su principal ventaja radica en que es bastante acertado a la hora del diagnóstico y de fácil acceso en los países con bajos niveles de desarrollo tecnológico. Como desventaja se registra que es un método muy laborioso, ya que puede llevar hasta un par de semanas, lo que hace que los cultivos sean susceptibles a contaminación, dificultando el diagnóstico. Además, el carácter invasivo de la toma de muestra aumenta el riesgo de aborto en el 1% de los casos [3,49].

Hibridación fluorescente *in situ*

El proceso para la realización de un cariotipo es lento y laborioso, y puede causar en la madre gestante ansiedad, ya que el diagnóstico puede tardar entre 1 a 2 semanas. Es así como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH, del inglés, *Fluorescent In Situ Hybridization*) constituye una prueba alternativa para ayudar a guiar el diagnóstico del síndrome de Down, ya que permite la obtención de los resultados en cuestión de 48 a 72 horas. En esta técnica, el ADN del feto hibrida con sondas marcadas fluorescentemente que hacen que emita señales en forma de puntos. Su eficiencia es relativamente alta porque se realiza en núcleos interfásicos, sin la necesidad de establecer cultivos celulares [3,50,51].

Ensayo de hibridación multiplex con sondas

El ensayo de hibridación multiplex con sondas (MLPA, del inglés, *Multiplex Ligation Probe Assay*) es una metodología para la detección de aneuploidías y aberraciones genéticas, que en el caso del síndrome de Down analiza fragmentos de DNA de los cromosomas 13, 18, 21, X y Y. En general, la técnica se basa en cuatro pasos básicos; la desnaturalización del ADN, la hibridación del ADN con las sondas marcadas y la ligación de las sondas y el ADN, seguidas por la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación de los productos mediante la técnica de Sanger [3].

Aunque esta metodología tiene una gran capacidad para procesar muestras a un bajo costo, no es viable para ser una metodología de diagnóstico cuando se requiere la diferenciación de mosaicismos [52]; además, no es posible realizarla directamente en sangre periférica, pues requiere la separación del ADN materno del ADN fetal mediante la identificación de las diferencias entre los perfiles de metilación de ambos ADN (alta metilación en el ADN del feto y menor metilación en el ADN de la madre) [37,53,54].

Amplificación y cuantificación de secuencia paróloga

La metodología de amplificación y cuantificación paróloga (PSQ, del inglés, *Paralogous Sequence Quantification*) es muy eficiente a la hora de diagnosticar aberraciones cromosómicas relacionadas con variaciones del número de copias (CNV, del inglés, *Copy Number Variations*). Esta metodología se basa en la amplificación de secuen-

cias parálogas (secuencias duplicadas de un mismo gen que ocupan dos posiciones diferentes en el mismo genoma), mediante reacción en cadena de la polimerasa, y la cuantificación de lo que se conoce como desajuste de secuencias parálogas, en la cual se mide la acumulación de sustituciones de genes parálogos en *loci* determinados mediante secuenciación [3].

La combinación de todos estos conceptos la vuelven una metodología para cuantificar la dosis génica o número de copias del cromosoma en análisis de una manera robusta, fácil de interpretar y de configurar para un diagnóstico específico, además que puede ser realizado en menos de 48 horas. Como desventaja presenta un costo elevado comparado con otras metodologías que también son usadas para el diagnóstico del síndrome de Down [55-57].

Secuenciación de nueva generación

Las metodologías de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés, *Next Generation Sequencing*) en cuestiones de diagnóstico, son unas de las tecnologías de vanguardia capaces de secuenciar genomas y exomas completos mediante lo que se conoce como secuenciación masiva y paralela. Estas tecnologías secuencian al mismo tiempo millones de fragmentos del material genético en estudio, lo que da como resultado datos de la secuenciación denominados Reads, los cuales pueden ser alineados o comparados frente a un genoma de referencia, o entre ellos mismos, mediante procesos bioinformáticos. Esta comparación sirve para encontrar variantes de un gen específico, variaciones en el número de copias, inserciones o deleciones en el genoma [3,58,59].

En el caso del diagnóstico de la trisomía 21, los millones de Reads obtenidos para este cromosoma se comparan con otros millones de Reads de otras partes del genoma; si el feto está afectado el número de Reads asignados al cromosoma 21 será ligeramente mayor en comparación con el obtenido a partir de fetos sin dicha afección. Aunque estas metodologías son altamente específicas y sensibles, son costosas y requieren de personal entrenado para su interpretación [58,59].

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa ha sido una herramienta fundamental para el desarrollo de la biología molecular aplicada en investigación y en el desarrollo de pruebas diagnósticas, que resulta ser muy versátil y fácilmente reproducible, con una alta eficiencia, sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del síndrome de Down. La PCR cuantitativa y la PCR en tiempo real son las más utilizadas, al igual que otras técnicas más sofisticadas como la hibridación genómica comparativa (CGH, del inglés, *Comparative Genome Hybridization*) y el uso de sondas TaqMan® y OpenArray®, que permiten aprovechar las diferencias epigenéticas de las secuencias en estudio [3,44,49-53].

La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa, en combinación con diferentes técnicas y usando distintos tipos de material genético, dan como resultado una amplia variedad de alternativas de análisis, entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa digital, de alto rendimiento, en tiempo real para duplicaciones segmen-

tarias, entre otras. Estas técnicas pueden solucionar los problemas que se encuentran en la reacción en cadena de la polimerasa convencional, como la dificultad del diagnóstico en presencia de mosaicismo [59], y permiten aplicar metodologías de enriquecimiento o hacer una diferenciación del ADN del feto del de la madre, lo que las hacen ideales como metodologías prenatales no invasivas [49-53].

Conclusión

La presencia de una tercera copia del material genético del cromosoma 21, ya sea parcial o total, desde sus primeras descripciones hace más de cien años, ha representado un reto para los investigadores debido no solo a sus complejas consecuencias en el desarrollo y la regulación fisiológica y celular de las personas que padecen esta enfermedad, sino también en sus aspectos genéticos, genómicos y transcriptómicos, factores de riesgo e incidencia.

En el afán por elucidar una clara explicación de los procesos celulares que toman lugar en este síndrome, se traza un camino hacia el hallazgo de nuevas estrategias que favorezcan la calidad de vida de las personas que padecen esta condición médica, así como a un diagnóstico eficiente en las primeras etapas embrionarias que permita a las familias con un nuevo integrante con este síndrome prepararse para su llegada, se concienticen de todos los cuidados médicos que este precisa y, principalmente, aprendan cómo potenciar el sinnúmero de capacidades que estos individuos tienen.

El desarrollo y la implementación efectiva de un entrenamiento para los profesionales de la salud es esencial para asegurar que brinden una consejería

adecuada a los padres que reciben los reportes de pruebas prenatales no invasivas compatibles para el síndrome de Down, que provea información imparcial y precisa a la madre gestante que genere la aceptación y cuidado de un niño con este síndrome, y que le brinde la autonomía en la decisión de la continuación de su embarazo [60].

Agradecimientos

A la Universidad CES por su apoyo al desarrollo de GenomaCES.

Referencias

1. **Cammarata-Scalisi F, Da Silva G, Cammarata-Scalisi G, Sifuentes A.** Historia del síndrome de Down. Un recuento lleno de protagonistas. *Can Pediatr* 2010;34 157-159.
2. **Wang Y, Zhang X, Ling B, He C, Xia Q, Chen F, et al.** Molecular detection of trisomy 21 by bicolour competitive fluorescent PCR. *J Clin Lab Anal* 2013;27:245-248.
3. **Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S.** "Down syndrome: an insight of the disease". *J Biomed Sci* 2015;22:41.
4. **Sierra-Romero MDC, Navarrete-Hernandez E, Canun-Serrano S, Reyes-Pablo AE, Valdes-Hernandez J.** [Prevalence of Down syndrome using certificates of live births and fetal deaths in Mexico 2008-2011]. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2014;71:292-297.
5. **Kamyab AR, Shahrokhi F, Shamsian E, Hayat Nosaied M, Dibajnia P, Hashemi M, et al.** Determination of sensitivity and specificity of a novel gene dosage assay for prenatal screening of trisomy 21 syndrome. *Clin Biochem* 2012;45:267-271.
6. **Bushman DM, Kaeser GE, Siddoway B, Westra JW, Rivera RR, Rehen SK, et al.** Genomic mosaicism with increased amyloid precursor protein (APP) gene copy number in single neurons from sporadic Alzheimer's disease brains. *Elife* 2015;4.
7. **Patel A, Yamashita N, Ascano M, Bodmer D, Boehm E, Bodkin-Clarke C, et al.** RCAN1 links impaired neurotrophin trafficking to aberrant development of the sympathetic nervous system in Down syndrome. *Nat Commun* 2015;6:10119.
8. **Souchet B, Latour A, Gu Y, Daubigney F, Paul JL, Delabar JM, et al.** Molecular rescue of DYRK1A overexpression in cystathionine beta

- synthase-deficient mouse brain by enriched environment combined with voluntary exercise. *J Mol Neurosci* 2015;55:318-323.
9. **Al-Biltagi M.** Down syndrome from epidemiologic point of view. *EC Paediatrics* 2015;2:82-91.
 10. **Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, et al.** Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1993;1:114-124.
 11. **Osato M, Ito Y.** Increased dosage of the RUNX1/AML1 gene: a third mode of RUNX leukemia? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2005;15:217-228.
 12. **Xavier AC, Ge Y, Taub JW.** Down syndrome and malignancies: a unique clinical relationship: a paper from the 2008 william beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn* 2009;11:371-380.
 13. **Sussan TE, Yang A, Li F, Ostrowski MC, Reeves RH.** Trisomy represses Apc(Min)-mediated tumours in mouse models of Down's syndrome. *Nature* 2008;451:73-75.
 14. **Baek K-H, Zaslavsky A, Lynch RC, Britt C, Okada Y, Siarey RJ, et al.** Down syndrome suppression of tumor growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 2009;459:1126-1130.
 15. **Salemi M, Barone C, Romano C, Salluzzo R, Caraci F, Cantarella RA, et al.** Pericentrin expression in Down's syndrome. *Neurol Sci* 2013;34:2023-2025.
 16. **Antonarakis SE.** Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nat Rev Genet* 2017;18:147-163.
 17. **Olmos-Serrano JL, Kang HJ, Tyler WA, Silbereis JC, Cheng F, Zhu Y, et al.** Down syndrome developmental brain transcriptome reveals defective oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 2016;89:1208-1222.
 18. **Prandini P, Deutsch S, Lyle R, Gagnebin M, Delucinge Vivier C, Delorenzi M, et al.** Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet* 2007;81:252-263.
 19. **Lim JH, Kim SY, Han JY, Kim MY, Park SY, Ryu HM.** Comprehensive investigation of DNA methylation and gene expression in trisomy 21 placenta. *Placenta* 2016;42:17-24.
 20. **Megarbane A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, Rethore MO, et al.** The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genet Med* 2009;11:611-616.
 21. **Sinet PM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, et al.** Mapping of the Down syndrome phenotype on chromosome 21 at the molecular level. *Biomed Pharmacother* 1994;48:247-252.
 22. **Pritchard MA, Kola I.** The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 1999;57:293-303.
 23. **Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, et al.** *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York; McGraw-Hill. 2001.
 24. **Shapiro BL.** Down syndrome-a disruption of homeostasis. *Am J Med Genet* 1983;14:241-269.
 25. **Olson LE, Roper RJ, Sengstaken CL, Peterson EA, Aquino V, Galdzicki Z, et al.** Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum Mol Genet* 2007;16:774-782.
 26. **Pelleri MC, Gennari E, Locatelli C, Piovesan A, Caracausi M, Antonaros F, et al.** Genotype-phenotype correlation for congenital heart disease in Down syndrome through analysis of partial trisomy 21 cases. *Genomics* 2017;109:391-400.
 27. **FitzPatrick DR, Ramsay J, McGill NI, Shade M, Carothers AD, Hastie ND.** Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Hum Mol Genet* 2002;11:3249-3256.
 28. **Chrast R, Scott HS, Papasavvas MP, Rossier C, Antonarakis ES, Barras C, et al.** The mouse brain transcriptome by SAGE: differences in gene expression between P30 brains of the partial trisomy 16 mouse model of Down syndrome (Ts65Dn) and normals. *Genome Res* 2000;10:2006-2021.
 29. **Mao R, Wang X, Spitznagel EL, Jr., Frelin LP, Ting JC, Ding H, et al.** Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome Biol* 2005;6:R107.
 30. **Thomas JW, Touchman JW, Blakesley RW, Bouffard GG, Beckstrom-Sternberg SM, Margulies EH, et al.** Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature* 2003;424:788-793.
 31. **Antonarakis SE, Epstein CJ.** The challenge of Down syndrome. *Trends Mol Med* 2006;12:473-479.
 32. **Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-487.
 33. **Lo YM.** Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin Chem* 2000;46:1903-1906.
 34. **Sifakis S, Zaravinos A, Maiz N, Spandidos DA, Nicolaides KH.** First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:472 e471-477.
 35. **Sifakis S, Koukou Z, Spandidos DA.** Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (review). *Mol Med Rep* 2015;11:2367-2372.
 36. **Hyland CA, Millard GM, O'Brien H, Schoeman**

- EM, Lopez GH, McGowan EC, et al.** Non-invasive fetal RHD genotyping for RhD negative women stratified into RHD gene deletion or variant groups: comparative accuracy using two blood collection tube types. *Pathology* 2017;49:757-764.
- 37. Chen CP, Wang YL, Chern SR, Wu PS, Chen YN, Chen SW, et al.** Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of low-level true mosaicism for trisomy 21 using uncultured amniocytes. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2016;55:285-287.
- 38. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, et al.** Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health* 2015;7:113-126.
- 39. Benn P, Cuckle H, Pergament E.** Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:15-33.
- 40. Gray KJ, Wilkins-Haug LE.** Have we done our last amniocentesis? Updates on cell-free DNA for Down syndrome screening. *Pediatr Radiol* 2018;48:461-470.
- 41. Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, Beck S, Hulten M, Lamnissou K, et al.** Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol* 2009;174:1609-1618.
- 42. Patsalis PC.** A new method for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome using MeDIP real time qPCR. *Appl Transl Genom* 2012;1:3-8.
- 43. Papageorgiou EA, Karagrigiou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC.** Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med* 2011;17:510-513.
- 44. Kamhieh-Milz J, Moftah RF, Bal G, Futschik M, Sterzer V, Khorramshahi O, et al.** Differentially expressed microRNAs in maternal plasma for the noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome (trisomy 21). *Biomed Res Int* 2014;2014:402475.
- 45. Liao JM, Zhou X, Zhang Y, Lu H.** MiR-1246: a new link of the p53 family with cancer and Down syndrome. *Cell Cycle* 2012;11:2624-2630.
- 46. Brás A, Rodrigues AS, Gomes B, Rueff J.** Down syndrome and microRNAs. *Biomed Rep* 2018;8:11-16.
- 47. Tóth T, Findlay I, Papp C, Tóth-Pál E, Marton T, Nagy B, et al.** Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *J Med Genet* 1998;35:126-129.
- 48. Sun L, Fan Z, Long J, Weng X, Tang W, Pang W.** Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy for chromosomes 21, 18, 13, X, and Y using segmental duplication quantitative fluorescent PCR (SD-QF-PCR). *Gene* 2017;627:72-78.
- 49. Vahab-Saadi A, Kushtagi P, Gopinath PM, Saityamoorthy K.** Quantitative fluorescence polymerase chain reaction (QF-PCR) for prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies. *Int J Hum Genet* 2010;10:121-129.
- 50. Samura O, Sohda S, Johnson KL, Pertl B, Ralston S, Delli-Bovi LC, et al.** Diagnosis of trisomy 21 in fetal nucleated erythrocytes from maternal blood by use of short tandem repeat sequences. *Clin Chem* 2001;47:1622-1626.
- 51. Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M.** Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet* 1994;343:1197-1198.
- 52. Elsayed GM, El Assiouty L, El Sobky ES.** The importance of rapid aneuploidy screening and prenatal diagnosis in the detection of numerical chromosomal abnormalities. *Springerplus* 2013;2:490.
- 53. Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH.** Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* 2003;40:907-912.
- 54. van Veghel-Plandsoen MM, Wouters CH, Kromosoeto JNR, den Ridder-Klünne MC, Halley DJJ, van den Ouweland AMW.** Multiplex ligation-depending probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism. *Eur J Hum Genet* 2011;19:1009-1012.
- 55. Deutsch S, Choudhury U, Sylvan A, Antonarakis SE.** Detection of trisomy 21 and other aneuploidies by paralogous gene quantification. *Am J Hum Genet* 2003 73:318.
- 56. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, et al.** A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004;36:299-303.
- 57. Snijders AM, Nowak N, Seagraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, et al.** Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001;29:263-264.
- 58. Rodríguez-Santiago B, Armengol L.** Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre-y postnatal. *Diagn Prenat* 2012;23:56-66.
- 59. Nepomnyashchaya YN, Artemov AV, Roumiantsev SA, Roumyantsev AG, Zhavoronkov A.** Non-invasive prenatal diagnostics of aneuploidy using next-generation DNA sequencing technologies, and clinical considerations. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1141-1154.
- 60. Gekas J, Langlois S, Ravitsky V, Audibert F, van den Berg DG, Haidar H, et al.** Non-invasive prenatal testing for fetal chromosome abnormalities: review of clinical and ethical issues. *Appl Clin Genet* 2016;9:15-26.