

# Original

## Polimorfismos del gen receptor de la vitamina D en personas con síndrome de Down

Sara Panizo-García<sup>1</sup>, Eva Parisi-Capdevila<sup>1</sup>,  
José Manuel Valdivielso-Revilla<sup>1</sup>, Lluís Roselló-Aubach<sup>2</sup>,  
Elvira Fernández-Giraldez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratori de Genètica Humana del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida.

<sup>2</sup>Servei de Reumatologia de l'Hospital de Santa Maria de Lleida.

<sup>3</sup>Servei de Nefrologia de l'Hospital Arnau de Vilanova de Lleida.

### Correspondencia:

Dr. Lluís Roselló-Aubach.

Servei de Reumatologia. Hospital de Santa Maria de Lleida.

Rovira Roure, 44.

25198 Lleida (España).

E-mail: lrosello@gss.scs.es

Artículo recibido: 22.02.06

### Resumen

**Fundamento:** El síndrome de Down (SD) es una alteración genética debida a la presencia de tres copias del cromosoma 21. Variaciones en los alelos del gen receptor de la vitamina D se han asociado a gran variedad de fenotipos y se han considerado factores de riesgo en determinadas poblaciones. En el presente trabajo se analiza si alguno de los genotipos del polimorfismo *BsmI* del receptor de la vitamina D se presenta con mayor frecuencia en personas con SD con respecto a la población general y la influencia que puede tener en diferentes fenotipos del SD.

**Pacientes y métodos:** Se estudiaron los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D en DNA de sangre periférica de 85 personas con SD y de 122 controles sin el síndrome. La determinación de cada genotipo se realizó con amplificación por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los segmentos que contienen los polimorfismos situados en el intron 8 (*BsmI*). Se analizaron las diferencias de distribución de genotipos entre los dos grupos, en el grupo con SD se relacionaron con diferentes parámetros antropométricos (edad, talla e índice de masa corporal), bioquímicos (calcio, vitamina D y paratohormona intacta) y con valores de masa ósea por densitometría (DEXA).

**Resultados:** El análisis de distribución del polimor-

fismo para *BsmI* muestra una mayor frecuencia del alelo B en el grupo con SD y del b en los controles ( $p = 0,015$ ). En las personas con SD la combinación de genotipos con respecto a los datos bioquímicos analizados y el resultado de la densitometría no muestra diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el genotipo homocigoto bb es más frecuente en los de talla alta ( $p = 0,04$ ) y el genotipo homocigoto BB en los de mayor edad ( $p = 0,03$ ).

**Conclusiones:** El alelo B del polimorfismo del intron 8 (*BsmI*) del gen del receptor de la vitamina D es más prevalente en personas con el SD. Los genotipos bb y BB son más frecuentes en aquellas con el SD de mayor talla y más longevas respectivamente, lo que hace pensar que estos podrían participar en estas dos características fenotípicas del SD.

**Palabras clave:** Gen Receptor de vitamina D. Polimorfismo *BsmI*. Síndrome de Down. Vitamina D.

**Vitamin D receptor gene polymorphisms in persons with Down's syndrome**

### Abstract

**Background:** Down syndrome (DS) is a genetic alteration associated to the presence of three copies of chromosome 21.

Variations in the presence of alleles in the vitamin D receptor (VDR) gene have been linked to a variety in the phenotype and also considered a risk factor in some populations. In the present paper, we analyze if a variation of the *BsmI* polymorphism in the VDR gene is overexpressed in patients with DS and if it is related to any phenotype of the patients.

**Patients and methods:** We studied the *BsmI* polymorphism of the vitamin D receptor in DNA from peripheral blood of 85 patients with DS and 122 controls. The detection of each phenotype is performed by amplification of the DNA sequences of intron 8 of the VDR gene by polymerase chain reaction (PCR). We analyzed the differences in distribution of the alleles in patients with DS and the correlation of the genotype to different anthropometric (age, height, body mass index) and biochemical parameters (calcium, vitamin D, PTH hormone, bone mass).

**Results:** The analysis of the distribution of the *BsmI* polymorphism showed a higher frequency of the *B* allele in the DS patients with respect to controls. In the same group of patients, the regression analysis showed no link with any biochemical parameter. However, the homozygous genotype *bb* is more frequently found in individuals with more height ( $p = 0.04$ ) and the *BB* in individuals with more age ( $p = 0.03$ ).

**Conclusions:** The allele *B* of the *BsmI* polymorphism of the VDR gene is more frequent in people with DS. The genotypes *bb* and *BB* are more frequent in taller and aged DS patients respectively. This result points out the possibility that VDR genotype could have influence in these two phenotypic characteristics of the DS patients.

**Key words:** *BsmI* polymorphism. Down's Syndrome. Vitamin D. Vitamin D Receptor Gene.

## Introducción

El síndrome de Down (SD) es una alteración genética producida por la presencia de tres copias del cromosoma 21. Con una incidencia aproximada de 1:1000 recién nacidos, el SD es la alteración congénita cromosómica más frecuente y la principal causa de retraso intelectual en la especie humana (1). En el 95% de los casos hay una no disyunción del cromosoma 21, el 4% son translocaciones y el 1% son mosaicos (2). El cromosoma 21 ha sido secuenciado enteramente y se estima que incluye unos 360 genes. A la región crítica del SD (DSCR), en triplicado, se la considera responsable de los múltiples rasgos propios del síndrome. Sin embargo, no se ha logrado correlacionar la totalidad de los complejos fenotipos del SD con los efectos de la dosificación genética que rodean al cromosoma extra 21

(3). En un estudio anterior se observó que individuos con SD presentaban un alta prevalencia de deficiencia de vitamina D y menor densidad mineral ósea (4). La vitamina D es un miembro de la superfamilia de hormonas esteroideas-tiroideas que ejerce una gran variabilidad de funciones biológicas tales como homeostasis cálcica, proliferación celular o diferenciación celular en muchos órganos diana. La mayoría de sus acciones las ejerce a través de control transcripcional de genes diana por activación del receptor nuclear de la vitamina D (VDR). Los receptores de la vitamina D se han aislado en diferentes lugares como la glándula paratiroides, en el páncreas, en las células hematopoyéticas, en los queratinocitos de la piel, en células endoteliales y del músculo liso vascular o en órganos reproductores. Variaciones en los alelos del gen VDR se han asociado a gran variedad de fenotipos que incluyen, entre otros, variaciones en los niveles circulantes de  $1,25-(OH)_2D_3$  (5), variaciones en la densidad mineral ósea (DMO) (6), algunos tipos de neoplasias (7), alteraciones en la tensión arterial (8) o incluso con la estatura, la fuerza muscular y el peso corporal (9,10). Mediante las enzimas de restricción *BsmI*, *Apa*, *Taq* (en el terminal 3 entre los exones 8 y 9) y *Fok* (en el exón 2) se han identificado 4 tipos de polimorfismos relacionados con el gen (VDR), aunque el más ampliamente utilizado es el primero y el que se presenta en este trabajo. Su objetivo es analizar si alguno de los genotipos del receptor de la vitamina D (VDR) presenta una mayor frecuencia en personas con el SD con respecto a la población general y qué influencia puede tener en los diferentes fenotipos del síndrome.

## Material y métodos

### 1. Pacientes

El estudio se llevó a cabo en 85 personas con SD y en 122 sanos, de raza blanca. De todos ellos se extrajeron muestras de sangre periférica. Los individuos con SD eran trabajadores en cuatro talleres para discapacitados intelectuales de la provincia de Lleida. Todos tenían un horario similar, trabajaban en sedestación y todos clasificados como discapacitados intelectuales, grado moderado o límite, ninguno de ellos con retraso mental grave. Se descartaron aquellas personas con antecedentes de osteopatía, endocrinopatía o hepatopatías que podrían alterar el metabolismo óseo, insuficiencia renal crónica, abuso de alcohol o los que recibían tratamiento con corticoides, bifosfonatos, calcio o vitamina D y tratamiento hormonal sustitutivo. Las personas del grupo control fueron incluidas de manera aleatoria y formaban parte de otros estudios epidemiológicos realizados en el laboratorio de Investigación del Hospital

Universitario Arnau de Vilanova-UDL (Lleida).

Se solicitó el consentimiento informado a las familias o tutores de todas las personas escogidas. Los individuos sanos fueron donantes voluntarios.

## 2. Determinación genotípica

El DNA se extrajo de los glóbulos blancos de las muestras de sangre periférica usando el kit «Aqua Pure Genomic», *DNA Kits* by BIO RAD. Con este DNA se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para conseguir amplificar la muestra. Los «primers» que se emplearon fueron 5'- AGTGTGCAGGC-GATCGTAG-3' en la hebra sentido, y 5'-ATAGGCA-GAACCATCTCTCAG-3' en la antisentido (Proligo). Las condiciones de PCR fueron 95°C durante 15 segundos, 64°C durante 30 segundos y 72°C un minuto, con un total de 35 ciclos («Applied Biosystems. Gene Amp. PCR System 2700»).

El locus genético del polimorfismo BsmI del gen VDR se determinó por análisis de los polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP), en el cual las cadenas se separan en un gel de acrilamida según su conformación, que depende del número de bases y de su naturaleza (Fig. 1).

También se puede determinar el polimorfismo digiriendo el producto de PCR con un enzima de restricción específico, en este caso el BsmI. La muestra digerida se corre en un gel de agarosa que se tiñe con bromuro de etidio. Esta técnica resulta más fiable que la anterior, pero también más cara por lo que se ha utilizado para confirmar algunos resultados obtenidos por SSCP (Fig. 2).

## 3. Parámetros

La densidad mineral ósea se determinó con un densitómetro de doble fotón lunar (DPX-L), portátil y con medición en calcáneo («Lunar Corporation, 313 W. Beltine HWY. Madison, WI 53713»). Se valora Z-Score y T-Score dando valores de normalidad, osteopenia u osteoporosis según criterios de la OMS, diferenciando por peso, altura y edad.

Los niveles de calcio y fosfatasas alcalinas (FA) se analizan con un autoanalizador de bioquímica Hitachi 747 («Roche Diagnostic», Mannheim, Alemania). La 25-hidroxivitamina D3 sérica con inmunoensayo quimioluminiscente («Dia Sorin Inc, Stilwater, Mn 55082-USA») con valor medio de referencia (VR) para Europa de 21,6 ng/mL y la PTHi (intacta) («Immunolite Intact PTH, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA») con VR:10-72 pg/mL.

El peso y la talla se valoró estando descalzos y con ropa mínima.

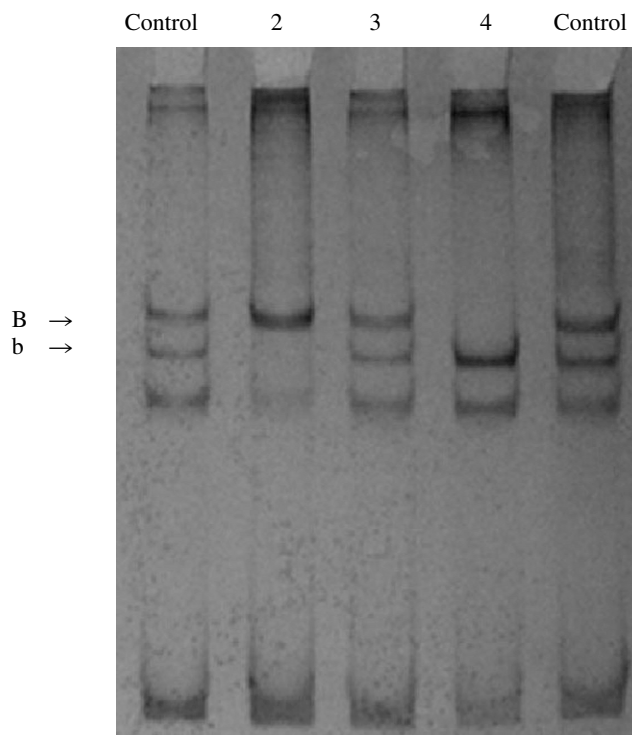


Figura 1. Detección del polimorfismo BsmI por SSCP. La línea 2 representa homocigoto bb, línea 3 heterocigoto Bb y línea 4 homocigoto BB.

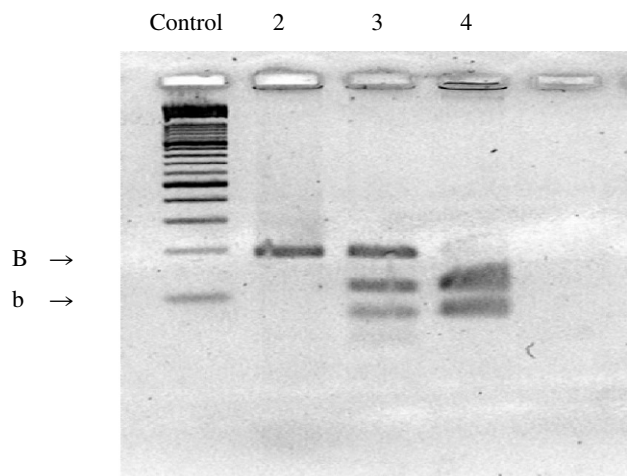


Figura 2. Detección del polimorfismo BsmI por PCR-RFLP. La banda alta representa el alelo B, la banda baja el alelo b. La línea 2: homocigoto BB, línea 3 heterocigoto Bb y la línea 4 homocigoto bb.

El índice de masa corporal (IMC) se calculó con la fórmula:  $IMC = \text{peso}/\text{talla}^2$  (Kg/m<sup>2</sup>).

## 4. Análisis estadístico

Se ha realizado un  $\chi^2$  para comparar la distribución de frecuencias de cada uno de los polimorfismos entre individuos con SD y sin Down. Mediante un análisis multivariante se ha analizado los factores que presentan significación estadística en relación con el polimorfismo en los individuos con SD.

En todos los casos se ha utilizado el programa estadístico SPSS 13.00 para Windows (SPSS, Inc) y en todas las pruebas el grado de significación considerado ha sido de 0,05 o menor.

## Resultados

Al comparar la distribución de genotipos en el polimorfismo *BsmI* se observan diferencias casi significativas ( $p = 0,062$ ) entre el grupo control y el grupo con SD. Los individuos con el SD presentan un mayor porcentaje de casos con genotipo bb y menor de BB (Tabla 1). Al analizar la distribución de los alelos, se aprecia que existen diferencias significativas ( $p = 0,015$ ), con una sobrerrepresentación del alelo B en los pacientes con SD (Tabla 2).

Tabla 1

**Número de individuos de cada uno de los genotipos en los grupos de población normal y Down. Entre paréntesis se indican los porcentajes de los mismos.**

	<i>Control</i>	<i>SD</i>
<b>BB</b>	19 (15,6%)	21 (24,7%)
<b>Bb</b>	52 (42,6%)	41 (48,2%)
<b>bb</b>	51 (41,8%)	23 (27,1%)
<b>Total</b>	122	85

Tabla 2

**Distribución de los alelos (B y b) en los grupos de población normal y Down. Entre paréntesis se indican los porcentajes de los mismos.**

	<i>Control</i>	<i>SD</i>
<b>B</b>	90 (36,9%)	83 (48,8%)
<b>b</b>	154 (63,1%)	87 (51,2%)
<b>Total</b>	244	170

Tabla 3

**Parámetros analizados en el grupo con síndrome de Down\***

<i>Síndrome de Down</i>	
<b>Sexo</b>	37 hembras; 48 varones
<b>Edad</b>	41,66 $\pm$ 1,27
<b>Peso</b>	65,09 $\pm$ 1,08
<b>Talla</b>	1,52 $\pm$ 0,11
<b>Índice de masa corporal (IMC)</b>	28,13 $\pm$ 0,49
<b>Paratohormona intacta</b>	39,65 $\pm$ 2,17
<b>Vitamina D</b>	30,41 $\pm$ 2,30
<b>Calcio</b>	94,64 $\pm$ 0,84
<b>Densidad Mineral Ósea</b>	-1,44 $\pm$ 0,14

\*Datos indicados como media  $\pm$  error estándar.

Tabla 4

**Comparación de los marcadores antropométricos, bioquímicos y DMO en función de los genotipos.**

<i>Síndrome de Down</i>			
	<b>BB</b>	<b>Bb</b>	<b>bb</b>
<b>Sexo</b>	12 hembras, 9 varones	15 hembras, 26 varones	10 hembras, 13 varones
<b>Edad</b>	46,10 $\pm$ 2,02	39,98 $\pm$ 1,87	40,61 $\pm$ 2,61
<b>Peso</b>	63,07 $\pm$ 2,18	64,89 $\pm$ 1,40	67,28 $\pm$ 2,40
<b>Talla</b>	1,50 $\pm$ 0,01	1,51 $\pm$ 0,02	1,57 $\pm$ 0,02
<b>Índice de masa corporal (IMC)</b>	28,09 $\pm$ 1,06	28,56 $\pm$ 0,75	27,37 $\pm$ 0,77
<b>Paratohormona intacta</b>	37,29 $\pm$ 3,16	42,67 $\pm$ 3,90	36,41 $\pm$ 2,76
<b>Vitamina D</b>	28,22 $\pm$ 4,39	27,28 $\pm$ 2,68	37,54 $\pm$ 5,71
<b>Calcio</b>	94,68 $\pm$ 0,98	95,99 $\pm$ 0,90	92,21 $\pm$ 2,49
<b>Densidad mineral ósea</b>	-1,58 $\pm$ 0,27	-1,50 $\pm$ 0,22	-1,21 $\pm$ 0,26

En la tabla 3 se indican los parámetros antropométricos analizados en el grupo con SD (sexo, edad, talla e IMC), parámetros bioquímicos (calcio, vitamina D, paratohormona intacta) y densitometría ósea (valor T-Score).

Al comparar diferentes variables mediante análisis multivariante, se observa que con respecto al genotipo son significativos la talla y edad en la población con SD. Los individuos con genotipo bb presentan tallas mayores en este grupo ( $p = 0,04$ ) (Fig. 3). Con respecto a la edad, los individuos con genotipo BB presentan mayor media de edad que el resto de genotipos ( $p = 0,03$ ) (Fig. 4).

En la Tabla 4 se presenta la comparación de los diferentes parámetros antropométricos, bioquímicos y densitométricos en los individuos con SD en función de los genotipos bb, Bb y BB. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variables bioquímicas ni en el hecho de padecer o no osteoporosis en función de los alelos para el VDR.

## Discusión

El gen del VDR se halla en el cromosoma 12(q12-q14) del mapa genético. El DNA se extrae de los monocitos periféricos y los polimorfismos alélicos son valorados mediante la enzima de restricción endonucleasa *BsmI*, después de amplificación específica por PCR. Se han hallado tres genotipos en el gen del VDR: los homocigotos BB y bb y el heterocigoto Bb. En el año 1992, Morrison y cols. (5) fueron los primeros en relacionar los polimorfismos del VDR con la concentración de osteocalcina y osteoporosis. El VDR juega un importante papel en la regulación de la homeostasis del calcio a través de la unión y de la traslocación nuclear de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , influyendo por tanto en la resorción

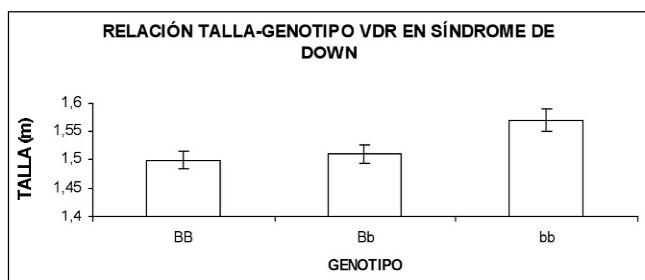


Figura 3. Relación entre la talla y el genotipo BB, Bb o bb en individuos con síndrome de Down. Los individuos con el genotipo bb presentan tallas mayores que los Bb y BB y a su vez el Bb mayor que el BB. La gráfica representa media  $\pm$  error estándar.

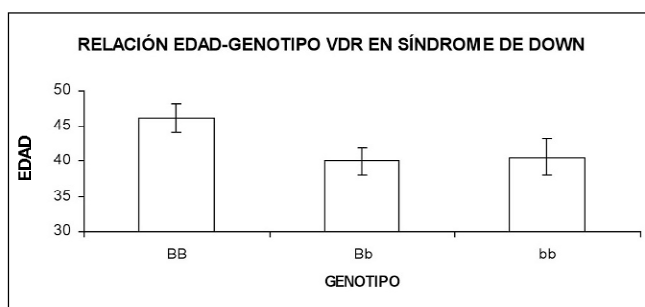


Figura 4. Relación entre la edad y el genotipo BB, Bb o bb en individuos con síndrome de Down. Los individuos con el genotipo BB presenta una media de edad mayor que los otros dos genotipos (Bb y bb). La gráfica representa media  $\pm$  error estándar.

ósea y en la absorción de calcio. Un meta-análisis muy reciente de Thakkinstein y cols. (6) identificó 61 estudios centrados en el polimorfismo *BsmI* con una conclusión global de que existía una influencia fundamentada del genotipo BB asociada a descenso en la DMO de columna. Variaciones en los alelos del gen VDR se han asociado también a otras enfermedades y características antropométricas humanas como el peso, la talla o el desarrollo muscular (7-10).

Éste es el primer estudio del que tenemos conocimiento de la asociación de los polimorfismos del gen VDR con el SD. El SD es una alteración genética producida por la presencia de tres copias del cromosoma 21, se considera como la alteración genética más frecuente y la principal causa de retraso intelectual en la especie humana. Las manifestaciones fenotípicas del síndrome son numerosas y, además del retraso intelectual, incluyen una talla baja atribuida a diferentes causas como a factores hormonales y a hipoxia crónica por apneas obstructivas, malformaciones cardíacas, alteraciones gastrointestinales, anomalías ortopédicas y, entre muchas otras, un envejecimiento precoz con alta frecuencia de demencia y una expectativa de vida menor a la de la población general atribuida a diversas causas (11-13).

El cromosoma 21 ha sido completamente secuenciado y se estima que incluye unos 360 genes; la presencia por triplicado de la región crítica del SD (21q22.2-q22.3) es considerada la responsable de los

múltiples rasgos fenotípicos del síndrome. Sin embargo, hay muchas dudas sobre la correlación de los abundantes y complejos fenotipos del SD con la aportación genética del cromosoma extra 21. Los estudios realizados en modelos murinos demuestran que algunas características como la patología cardíaca, malformaciones del cerebelo con reducción de la densidad celular granular o la dismorfia craneofacial en el SD podrían estar relacionadas con la dosificación genética aportada por la triple copia de la región crítica del cromosoma 21 (14); sin embargo existe otra hipótesis que considera que la sobre-expresión del amplio número de genes por triplicado que irrumpe en la homeostasis genética total perjudica la regulación genética durante el proceso de desarrollo. En la porción distal del cromosoma 16 del ratón se encuentran 141 genes ortólogos del cromosoma 21 humano y con ello se ha elaborado un modelo experimental de ratón que posee trisomía parcial de esta región, el ratón Ts65Dn; con ello se ha demostrado que existen varios grupos de genes que participan en vías o procesos celulares comunes y que, a su vez, también participan en un mismo proceso con efecto acumulado por la suma de lo que aporta cada uno de ellos y con consecuencias finales significativas. Teniendo en cuenta esta teoría hemos analizado si alguno de los polimorfismos del gen VDR presenta una mayor frecuencia en individuos con el SD con respecto a la población general y qué influencia puede tener en diferentes fenotipos del síndrome.

Se han estudiado los polimorfismos del gen VDR en el DNA de sangre periférica de 85 personas con el SD y de 122 controles sin el síndrome. La determinación de cada genotipo se ha realizado por amplificación por la técnica de PCR de los segmentos que contienen los polimorfismos situados en el intron 8 (*BsmI*). Las diferencias de distribución de genotipos entre los dos grupos muestran que los individuos con SD presentan un mayor porcentaje del alelo B mientras que en los controles predomina el b ( $p = 0,015$ ). En el SD se ha descrito una mayor prevalencia de osteoporosis asociado entre otros factores a hipovitaminosis D (4, 15); sin embargo, al comparar los resultados de la DMO y niveles de vitamina D, calcio, fosfatasas alcalinas y PTHi con los polimorfismos del gen VDR agrupados en «favorables» (bb) y «desfavorables» (BB y Bb) no hemos encontrado suficiente relación estadística a favor de ninguno de ellos. Sin embargo, nos ha sorprendido encontrar una mayor frecuencia del gen homocigoto bb en los SD de talla alta y del homocigoto BB en los de mayor edad, hechos no descritos previamente y dado que el genotipo más frecuente en este grupo de la población es el Bb, éste podría comportarse como «desfavorable» y justificar la talla baja y la menor supervivencia.

## Conclusiones

El alelo B del polimorfismo del intrón 8 (*BsmI*) del gen receptor de la vitamina D es más prevalente en personas con SD. Los genotipos bb y BB son más frecuentes en aquellos individuos con SD con mayor talla y más longevos respectivamente, lo que hace pensar que podrían participar en las características fenotípicas del SD. Es probable que la inclusión de otros genes así como la interacción de los genes entre sí y de los genes con factores ambientales den una respuesta que permita definir si estos estudios genéticos constituyen una herramienta útil para la prevención y pronóstico del síndrome de Down.

## Agradecimientos

A los responsables de los Centros ACUDAM, AS-PROS, APROMI y ASPAMIS, a las personas con síndrome de Down participantes, cuerpo médico, fisioterapeutas, monitores y resto de personal por las facilidades encontradas para la realización de este trabajo. Al laboratorio FAES por su inestimable ayuda.

## Bibliografía

1. Rehder H, Fritz B. Genetic causes of mental retardation. *Wien Med Wochenschr* 2005; 155: 258-67.
2. Antonarakis SE. 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 1998; 51: 1-16.
3. Olson LE, Richsmeier JT, Leszl J, Reeves RH. A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science* 2004; 306: 687-90.
4. Roselló LI, Torres R, Boronat T, Lobet R, Puerto E. Osteoporosis prevalence in a Down syndrome population, measuring different parameters. *DS-SD International medical review on Down syndrome* 2004; 8: 18-22.
5. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *PNAS* 1992; 89: 6665-9.
6. Thakkestian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-Analysis of molecular association studies: Vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *JBMD* 2004; 19: 419-28.
7. Matusiak D, Murillo G, Carroll RE, Mehta RG, Benya RV. Expression of vitamin D receptor and 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase in normal and malignant human colon. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2005; 14: 2370-6.
8. Muray S, Parisi E, Cardús A, Craver L, Marco MP, Fernández E. Influencia del polimorfismo del gen receptor de la vitamina D y de la 25-hidroxivitamina D en la tensión arterial de individuos sanos. *Nefrología* 2003; 23 Supl 2: 32-6.
9. Xiong DH, Xu FH, Liu PY, Shen H, Long JR, Elze L, Recker RR, Deng HW. Vitamin D receptor gene polymorphism are linked to and associated with adult height. *J Med Genet* 2005; 42: 228-34.
10. Grundberg E, Brändström H, Ribom EL, Ljunggren Ö, Mallmin H, Kindmark A. Genetic variation in the human vitamin D receptor is associated with muscle strength, fat mass and body weight in Swedish women. *Eur J Endocrinology* 2004; 150: 323-8.
11. Zigman WB, Jenkins EC, Tycko B, Schupf N, Silverman W. Mortality is associated with apolipoprotein E epsilon4 in nondemented adults with Down syndrome. *Neurosci Lett* 390: 93-7.
12. Day SM, Strauss DJ, Shavelles RM, Reynolds RJ. Mortality and causes of death in persons with Down syndrome in California. *Dev Med Child Neurol*. 2005; 47: 171-6.
13. Hill DA, Gridley G, Cnattingius S, Møller M, Linet M, Adami HO, Olsen JH, Nyren O, Fraumeni JF Jr. Mortality and cancer incidence among individuals with Down syndrome. *Arch intern Med* 2003; 163: 705-11.
14. Vacik T, Ort M, Gregorová S, Strnad P, Blatný R, Conte N, Bradley A, Bures J, Forejt J. Segmental trisomy of chromosome 17: A mouse model of human aneuploidy syndromes. *PNAS* 2005; 102: 4500-5.
15. Angelopoulou N, Matziari C, Tsimaras V, Sakadamis A, Souftas V, Mandroukas K. Bone mineral density and muscle strength in young men with mental retardation (with and without Down syndrome). *Calcified Tissue International* 2000; 66: 176-80.