

Progetto Genoma 21: una strada verso la scoperta di nuovi approcci terapeutici per la trisomia 21 (sindrome di Down)



Laboratorio di Genomica



Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale
Sede Operativa di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata
Università di Bologna

Versione Giugno 2021

*"La troveremo. E' impossibile che non riusciamo a trovarla.
E' una impresa intellettuale meno difficile che spedire un uomo sulla Luna.
Se trovo come guarire la trisomia 21, allora si aprirà la strada verso la guarigione di tutte le altre
malattie di origine genetica."*

Jérôme Lejeune (sulla terapia per la trisomia 21)

Progetto Genoma 21: una strada verso la scoperta di nuovi approcci terapeutici per la trisomia 21 (sindrome di Down)

1. Premessa

La sindrome di Down (sdD) è una condizione genetica caratterizzata dalla presenza di un cromosoma 21 in più nelle cellule delle persone con tale sindrome.

È la più frequente anomalia genetica dell'uomo (1 su 400 concepiti e 1 su 700 nati vivi).

Questa anomalia cromosomica causa una "sindrome", cioè un insieme di "tratti" descritti per la prima volta nel 1866 dal medico inglese John L. Down (da cui il nome della sindrome) e che si possono manifestare con combinazioni e grado di severità variabili.

Alcune caratteristiche comuni sono occhi "a mandorla", radice del naso appiattita, bassa statura. La disabilità intellettiva, seppure in grado variabile, è la condizione sempre presente nelle persone con sdD e coinvolge soprattutto la sfera del linguaggio e del pensiero simbolico, mentre è nota la loro capacità di suscitare intorno a sé un clima di intensità affettiva più grande del normale.

Nel 1959 il Prof. Jérôme Lejeune e Coll. hanno dimostrato che la causa della sindrome è la trisomia 21, ossia una mutazione genetica che comporta la presenza di un cromosoma 21 in tre copie (invece delle normali due) nelle cellule delle persone con sdD (Lejeune et al. 1959).

Il filone di ricerca sulla trisomia 21 è stato portato all'Università di Bologna dalla Prof.ssa Maria Zannotti, ora in pensione, che alla fine degli anni '60 fu allieva a Parigi del Prof. Lejeune. Le ricerche vengono ora portate avanti dal gruppo da lei creato e ora guidato dal Prof. Pierluigi Strippoli.



Parigi, 1969 - La Prof.ssa Maria Zannotti (la seconda da destra) in riunione con il gruppo del Prof. Jérôme Lejeune (seduto al centro).

Lo studio è condotto in collaborazione con il Prof. Guido Cocchi dell'Unità Operativa di Neonatologia del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna ed è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico stesso.

Il progetto costituisce, a nostra conoscenza, la più ampia ricerca scientifica clinico-sperimentale sulla sindrome di Down condotta in Italia e mirata alla individuazione di una cura per la disabilità intellettiva causata dalla presenza di un cromosoma 21 in più. Il progetto riguarda al momento **230** bambini con trisomia 21 tra i 3 e i 16 anni, con ricadute possibili su tutte le persone con trisomia 21 (38.000 solo in Italia), che è la più frequente anomalia genetica dell'uomo.

Stiamo studiando in dettaglio la regione critica del cromosoma 21 associata alla sindrome di Down e il metaboloma (l'insieme dei metaboliti) di modelli cellulari trisomici e di bambini con la sindrome che saranno anche sottoposti a valutazione clinica e cognitiva accurata. La mole di dati così ottenuti e correlati tra loro sarà utile per individuare specifiche reazioni metaboliche alterate che potrebbero diventare efficaci bersagli terapeutici per la cura della disabilità intellettiva della sindrome di Down.

Nel 2019 abbiamo scritto il capitolo sulla genetica e genomica della sindrome di Down in un nuovo libro internazionale dedicato alla sindrome, riepilogando il lavoro svolto dal Prof. Lejeune in merito, ed esponendo i nostri principali risultati:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211609519300016>

https://books.google.it/books?id=dtitDwAAQBAI&pg=PA1&hl=it&source=gbs_toc_r&cad=3-v=onepage&q&f=false

2. Risultati raggiunti al Giugno 2021

2.1 Creazione di **mappe trascrizionali** del cervello, dell'ippocampo, delle cellule del sangue, del cuore e della tiroide per studiare l'attività dei geni umani, in particolare del cromosoma 21, in tessuti nei quali si manifestano gli effetti della trisomia 21. Abbiamo pubblicato in merito sei articoli su riviste scientifiche internazionali:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185649>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108741>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25476127>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27345625>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28923001>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29740474>

Nel 2021 abbiamo pubblicato una mappa del trascrittoma del sangue di bambini con trisomia 21 ottenuta utilizzando la tecnica dell'RNA-Seq, in collaborazione con il MAGI's Lab di Trento:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33933170/>

2.2 Rianalisi di tutti i casi pubblicati di trisomia 21 parziale ai fini della identificazione, sul cromosoma 21 umano, della **regione critica** responsabile della **sindrome di Down** e in particolare associata alla disabilità intellettiva. I risultati identificano e delimitano tale regione e sono stati pubblicati il 22 Aprile 2016 su *Human Molecular Genetics*:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27106104/>

Nel 2019 è stato pubblicato un secondo articolo che conferma su 10 nuovi casi di trisomia 21 parziale, indipendentemente dal primo articolo pubblicato in merito, la rilevanza della "regione critica" per la diagnosi di sdD, per cui ad oggi non troviamo alcuna eccezione alla regola secondo la quale in assenza di tre copie di questa particolare regione non vi è diagnosi di sindrome di Down.

Questo in linea con l'idea del Prof. Lejeune che sul cromosoma 21 vi siano pochi geni "colpevoli", e molti "innocenti":

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31237416>

Inoltre, con la stessa metodologia abbiamo identificato anche la regione critica per la presenza di cardiopatie congenite nella sindrome di Down:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28648597>

2.3 Raccolta di campioni di sangue e di urina, ad oggi, da 227 bambini con sdD e da 77 soggetti di controllo, estrazione del DNA e dell'RNA e costituzione di una **banca di campioni biologici** (plasma, DNA, RNA e urina).

Abbiamo analizzato per la prima volta il profilo metabolomico del plasma e delle urine nella sdD. L'articolo è stato pubblicato il 14 Febbraio 2018 su *Scientific Reports*, e dimostra che nella sdD ci sono anomalie specifiche del metabolismo:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445163>

Un nuovo articolo sul profilo metabolomico nel plasma è stato pubblicato il 26 Giugno 2020 su *Scientific Reports*, confermando in una casistica più ampia che nella sdD ci sono anomalie specifiche del metabolismo, al momento non correlabili con il grado di disabilità intellettiva:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32591596/>

Nel 2021 abbiamo pubblicato, sempre su *Scientific Reports*, risultati che mostrano specifiche relazioni tra il **ciclo dei monocarboni** e le abilità cognitive nei bambini con sindrome di Down:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33608632/>

Anche alcune frazioni del plasma sanguigno contenenti microRNA hanno rivelato specifiche differenze rispetto ai bambini senza il cromosoma in più, come mostrato in un articolo pubblicato in collaborazione con l'Università di Brescia sulla rivista *International Journal of Molecular Medicine*:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31017260>

2.4 L'utilizzo di un **modello cellulare (fibroblasti trisomici ed euploidi)** ha consentito di verificare gli effetti delle varie forme di folati sulla azione antiproliferativa del metotressato (MTX), un agente antifolico al quale le cellule delle persone con sdD sono ipersensibili. Questi dati potranno essere interpretati nell'ambito di un modello del metabolismo specifico per la trisomia 21, avendo dimostrato che le differenti forme di acido folico non sono equivalenti per quanti riguarda gli effetti sulla crescita cellulare.

L'articolo è stato pubblicato nel 2019 sul *Journal of Cellular Physiology*:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30667057>

3. Nuovi Obiettivi 2021-2022

Lo **scopo** di questo progetto è quello di individuare marcatori specifici per la sindrome di Down che possano diventare bersagli di terapie innovative.

La scoperta della "regione critica" per la sindrome di Down è stato un passo fondamentale per la nostra ricerca e proprio alla luce di questo risultato abbiamo definito nuovi obiettivi.

3.1 Caratterizzazione della regione altamente ristretta critica per la sindrome di Down (*Highly Restricted Down Syndrome Critical Region, HR-DSCR*). Questa parte del progetto si propone di analizzare in dettaglio questa regione allo scopo di identificare **nuovi geni** del cromosoma 21 che ipotizziamo essere essenziali per la manifestazione della sindrome di Down. Nella HR-DSCR ad oggi non sono stati descritti geni funzionali, per individuarli verranno

utilizzati modelli cellulari trisomici per il cromosoma 21: fibroblasti e linee linfoblastoidi. Grazie ad una collaborazione internazionale avviata con il gruppo del Prof. Patrick Harrison, University College Cork, Irlanda, verrà eliminata in maniera selettiva la HR-DSCR mediante il sistema CRISPR/Cas9 per studiare le alterazioni imputabili a questa regione.

I metaboliti rilasciati dalle cellule nel loro terreno di coltura saranno poi dosati con saggi **ELISA** oppure mediante analisi metabolomiche di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), in collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Paola Turano, Università di Firenze.

3.2 Profilo metabolico nei campioni biologici di persone con sindrome di Down. Si proseguirà con l'ampliamento della banca biologica raccogliendo campioni di urina, plasma e sangue.

Seguendo l'ipotesi del Prof. Lejeune, l'analisi del plasma si focalizzerà in particolare sui metaboliti delle vie metaboliche note come **ciclo dei monocarboni** e **ciclo del folato**, studiando 30 bambini con sdD e di 30 soggetti di controllo. Lo scopo è quello di identificare specifiche alterazioni del metabolismo e di associare queste alterazioni a determinati geni localizzati sul cromosoma 21, in particolare nella "**regione critica**", per identificare possibili bersagli di un intervento terapeutico.

Si cercheranno correlazioni tra i risultati dell'analisi metabolomica, le caratteristiche cliniche e i risultati delle valutazioni cognitive.

I metodi sperimentali sono descritti in dettaglio nell'articolo da noi pubblicato che descrive il Progetto e nei riferimenti bibliografici ivi citati:

<http://www.spp-j.com/spp/1-1/spp.2013.12R0005/>

"Tutta la difficoltà della ricerca è come scoprire il musicista discorde, perché l'orchestra della vita ha circa cinquantamila musicisti"
(Jérôme Lejeune)

4. Curriculum vitae del responsabile scientifico - Prof. Pierluigi Strippoli

Pierluigi Strippoli è professore associato di Biologia applicata presso la Università di Bologna, dove insegna attualmente Genetica nel Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia e Genomica in quello in Biotecnologie Mediche.

Presso la stessa sede è alla guida del Laboratorio di Genomica del Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale (DIMES).

Ha applicato l'uso di tecniche di genetica molecolare e di genomica allo studio delle malattie del sangue, del cancro del colon-retto e della trisomia 21, ideando e realizzando alcuni strumenti originali di biologia computazionale per l'analisi del genoma umano e pubblicando 75 articoli su riviste scientifiche internazionali.

Negli ultimi anni il Prof. Strippoli ha lanciato uno studio sistematico della sindrome di Down basato sulla integrazione di dati clinici, biochimici, genetici e bioinformatici allo scopo di identificare nuove possibilità di cura per la disabilità intellettiva associata a questa forma di trisomia.

<https://www.unibo.it/sitoweb/pierluigi.strippoli/cv>

5. Gruppo di ricerca

L'Unità Operativa che coordina la ricerca opera nel Laboratorio di Genomica del Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale (Direttore: Prof. Mauro Gargiulo), Sede Operativa di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata, Università di Bologna.

In particolare si occuperanno stabilmente di questo progetto:

Nome e cognome	Laurea	Ruolo
Pierluigi Strippoli	Medicina e Chirurgia	Professore associato confermato
Lorenza Vitale	Medicina e Chirurgia	Ricercatore
Maria Chiara Pelleri	Biotecnologie	Ricercatore a Tempo Determinato-B
Maria Caracausi	Biotecnologie	Ricercatore a Tempo Determinato-B
Allison Piovesan	Biotecnologie	Ricercatore a Tempo Determinato-B
Francesca Antonaros	Biotecnologie	Dottorando di Ricerca
Giuseppe Ramacieri	Medicina e Chirurgia	Borsista
Beatrice Vione	Biotecnologie	Borsista
Caterina Gori	Medicina e Chirurgia	Borsista

Il referente clinico della ricerca, che succede al Prof. Guido Cocchi in seguito al suo pensionamento, è la Dott.ssa Chiara Locatelli (Unità Operativa di Neonatologia diretta dal Prof. Luigi Corvaglia, Policlinico S.Orsola-Malpighi).

Ci avvarremo inoltre della collaborazione della Prof.ssa Maria Zannotti, già Professore associato di Biologia Applicata presso l'Università di Bologna e attualmente in pensione.

6. Collaborazioni internazionali e nazionali sul Progetto

Prof. Marco Seri

Unità Operativa di Genetica Medica, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC), Università di Bologna, Bologna, Italia

Prof.ssa Paola Turano

Centro di Risonanze Magnetiche (CERM), Università di Firenze, Firenze, Italia.

Prof. Patrick Harrison

Physiology Department, University College Cork, Cork, Irlanda

Dott.ssa Silvia Lanfranchi

Prof. Renzo Vianello

Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione, Università di Padova, Padova, Italia

Dott.ssa Annalisa Radeghieri

Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università di Brescia, Brescia, Italia

Dott. Matteo Bertelli

Dott.ssa Giulia Guerri

MAGI'S Lab, Rovereto, TN, Italia.

7. Finanziamenti

Per il biennio **2021 - 2022**, sulla base dei nuovi obiettivi sopra indicati, prevediamo una spesa di **120.000 Euro/anno** (**75.000** Euro/anno per tre borse di studio o assegni di ricerca e **45.000** Euro/anno per le spese del Laboratorio).

La seguente suddivisione tra le varie voci di spesa (esclusi gli strumenti inventariabili) è solo indicativa (variabile nel dettaglio a seconda delle esigenze sperimentali emerse nel corso della ricerca):

Biologia Molecolare/ Spese Accessorie	
Plastiche e reagenti di laboratorio	3.500,00
Puntali, provette	3.500,00
Reagenti per PCR, gel e purificazione del DNA	3.500,00
Sequenziamento del DNA - RNA-Seq	9.000,00
Reagenti per clonaggio in vivo	3.000,00
RNA e cDNA	3.500,00
Reagenti per Northern-blot	2.500,00
Reagenti per "Real-Time" PCR	2.500,00
Reagenti per colture cellulari e saggi funzionali	4.000,00
Hardware/software per analisi dati	3.000,00
Spese di pubblicazione dei risultati	4.000,00
Spese per missioni/collaborazioni [Partecipazioni a congressi e riunioni di lavoro, organizzazione di seminari]	3.000,00
Totale per un anno	45.000,00

Tutte le donazioni al Laboratorio di Genomica saranno utilizzate per:

- 1. Finanziare i giovani ricercatori** (borsisti, studenti di dottorato, ricercatori post-dottorato e contrattisti) che lavorano sul Progetto.
- 2. Acquistare materiali**, reagenti, strumenti e servizi necessari al lavoro sperimentale e sostenere alcune **spese** generali di ricerca (pubblicazioni, missioni ecc.).

8. Bibliografia

Antonaros F, Olivucci G, Cicchini E, Ramacieri G, Pelleri MC, Vitale L, Strippoli P, Locatelli C, Cocchi G, Piovesan A, Caracausi M. MTHFR C677T polymorphism analysis: A simple, effective restriction enzyme-based method improving previous protocols. *Mol Genet Genomic Med.*, 7:e628, 2019.

Antonaros F, Ghini V, Pulina F, Ramacieri G, Cicchini E, Mannini E, Martelli A, Feliciello A, Lanfranchi S, Onnivello S, Vianello R, Locatelli C, Cocchi G, Pelleri MC, Vitale L, Strippoli P, Luchinat C, Turano P, Piovesan A, Caracausi M. Plasma metabolome and cognitive skills in Down syndrome. *Sci Rep*, 10:10491, 2020.

Antonaros F, Lanfranchi S, Locatelli C, Martelli A, Olivucci G, Cicchini E, Carosi Diatricch L, Mannini E, Vione B, Feliciello A, Ramacieri G, Onnivello S, Vianello R, Vitale L, Pelleri MC, Strippoli P, Cocchi G, Pulina F, Piovesan A, Caracausi M. One-carbon pathway and cognitive skills in children with Down syndrome. *Sci Rep*, 11:4225, 2021.

Antonaros F, Zenatelli R, Guerri G, Bertelli M, Locatelli C, Vione B, Catapano F, Gori A, Vitale L, Pelleri MC, Ramacieri G, Cocchi G, Strippoli P, Caracausi M, Piovesan A. The transcriptome profile of human trisomy 21 blood cells. *Hum Genomics*, 15:25, 2021.

Caracausi M, Vitale L, Pelleri MC, Piovesan A, Bruno S, Strippoli P. A quantitative transcriptome reference map of the normal human brain. *Neurogenetics*, 15:267-287, 2014.

Caracausi M, Rigon V, Piovesan A, Strippoli P, Vitale L, Pelleri MC. A quantitative transcriptome reference map of the normal human hippocampus. *Hippocampus*, 26:13-26, 2016.

Caracausi M, Ghini V, Locatelli C, Mericio M, Piovesan A, Antonaros F, Pelleri MC, Vitale L, Vacca RA, Bedetti F, Mimmi MC, Luchinat C, Turano P, Strippoli P, Cocchi G. Plasma and urinary metabolomic profiles of Down syndrome correlate with alteration of mitochondrial metabolism. *Sci Rep*, 8:2977, 2018.

Epstein CJ. Down syndrome, trisomy 21. In: Scriver CR, Beaudet al. Sly WS, Valle D. *Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, NY, 1989. Pp. 291-326.

Gardiner K, Costa AC. The proteins of human chromosome 21. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 142C:196-205, 2006.

Gardiner KJ. Molecular basis of pharmacotherapies for cognition in Down syndrome. *Trends Pharmacol Sci*, 31:66-73, 2010.

Korenberg JR. Down syndrome: the crucible for treating genomic imbalance. *Genet Med*, 11:617-619, 2009.

Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 248:1721-1722, 1959.

Lenzi L, Facchin F, Piva F, Giulietti M, Pelleri MC, Frabetti F, Vitale L, Casadei R, Canaider S, Bortoluzzi S, Coppe A, Danieli GA, Principato G, Ferrari S, Strippoli P. TRAM (Transcriptome Mapper): database-driven creation and analysis of transcriptome maps from multiple sources. *BMC Genomics*, 12:121, 2011.

Letourneau A, Antonarakis SE. Genomic determinants in the phenotypic variability of Down syndrome. *Prog Brain Res*, 197:15-28, 2012.

Mégarbané A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, Rethoré MO, Delabar JM, Mobley WC. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genet Med*, 11:611-616, 2009.

Patterson D. Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum Genet*, 126:195-214, 2009.

Pelleri MC, Piovesan A, Caracausi M, Berardi AC, Vitale L, Strippoli P. Integrated differential transcriptome maps of Acute Megakaryoblastic Leukemia (AMKL) in children with or without Down Syndrome (DS). *BMC Med Genomics*, 7:63, 2014.

Pelleri MC, Cicchini E, Locatelli C, Vitale L, Caracausi M, Piovesan A, Rocca A, Poletti G, Seri M, Strippoli P, Cocchi G. Systematic reanalysis of partial trisomy 21 cases with or without Down syndrome suggests a small region on 21q22.13 as critical to the phenotype. *Hum Mol Genet*, 25:2525-2538, 2016.

Pelleri MC, Gennari E, Locatelli C, Piovesan A, Caracausi M, Antonaros F, Rocca A, Donati CM, Conti L, Strippoli P, Seri M, Vitale L, Cocchi G. Genotype-phenotype correlation for congenital heart disease in Down syndrome through analysis of partial trisomy 21 cases. *Genomics*, 109:391-400, 2017.

Pelleri MC, Cattani C, Vitale L, Antonaros F, Strippoli P, Locatelli C, Cocchi G, Piovesan A, Caracausi M. Integrated Quantitative Transcriptome Maps of Human Trisomy 21 Tissues and Cells. *Front Genet*, 9:125, 2018.

Pelleri MC, Cicchini E, Petersen MB, Tranebjaerg L, Mattina T, Magini P, Antonaros F, Caracausi M, Vitale L, Locatelli C, Seri M, Strippoli P, Piovesan A, Cocchi G. Partial trisomy 21 map: Ten cases further supporting the highly restricted Down syndrome critical region (HR-DSCR) on human chromosome 21. *Mol Genet Genomic Med*, 7:e797, 2019.

Pritchard M, Reeves RH, Dierssen M, Patterson D, Gardiner KJ. Down syndrome and the genes of human chromosome 21: current knowledge and future potentials. Report on the Expert workshop on the biology of chromosome 21 genes: towards gene-phenotype correlations in Down syndrome. Washington D.C., September 28-October 1, 2007. *Cytogenet Genome Res*, 121:67-77, 2008.

Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet*, 361:1281-1289, 2003

Roper RJ, Reeves RH. Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genet*, 2:e50, 2006.

Salvi A, Vezzoli M, Busatto S, Paolini L, Faranda T, Abeni E, Caracausi M, Antonaros F, Piovesan A, Locatelli C, Cocchi G, Alvisi G, De Petro G, Ricotta D, Bergese P, Radeghieri A. Analysis of a nanoparticle-enriched fraction of plasma reveals miRNA candidates for Down syndrome pathogenesis. *Int J Mol Med*, 43:2303-2318, 2019.

Sinet PM, Allard D, Lejeune J, Jerome H. Letter: Gene dosage effect in trisomy 21. *Lancet*, 1:276, 1975.

Strippoli P, Pelleri MC, Caracausi M, Vitale L, Piovesan A, Locatelli C, Mimmi MC, Berardi AC, Ricotta D, Radeghieri A, Barisani D, Basik M, Monaco MC, Ghezzi A, Seri M, Cocchi G. An integrated route to identifying new pathogenesis-based therapeutic approaches for trisomy 21 (Down Syndrome) following the thought of Jérôme Lejeune, *Sci Postprint*, 1:e00010, 2013.

Strippoli P, Pelleri MC, Piovesan A, Caracausi M, Antonaros A, Vitale L. Chapter One - Genetics and genomics of Down syndrome. *International Review of Research in Developmental Disabilities*, Academic Press, 56:1-39, 2019.

Vitale L, Serpieri V, Lauriola M, Piovesan A, Antonaros F, Cicchini E, Locatelli C, Cocchi G, Strippoli P, Caracausi M. Human trisomy 21 fibroblasts rescue methotrexate toxic effect after treatment with 5-methyl-tetrahydrofolate and 5-formyl-tetrahydrofolate. *J Cell Physiol*, Jan 22, 2019.