
Análisis de microdeleciones en 22q11 en pacientes colombianos con cardiopatía congénita no sindrómica.

Marleny Salazar¹, Guiovcanny Villalba², Heidi Mateus³, Victoria Villegas³, Dora Fonseca³, Federico Núñez⁴, Víctor Caicedo⁴, Sonia Pachón⁴ y Jaime E. Bernal⁵.

¹Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, Universidad del Quindío. Armenia, Colombia.

²Universidad de Los Andes. Bogotá, Colombia.

³Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia.

⁴Fundación Clínica Shaio. Bogotá, Colombia.

⁵Instituto de Genética Humana, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia

Palabras clave: cardiopatías congénitas, microdelección 22q11, PCR multiplex, densitometría, TUPLE 1, Tetralogía de Fallot, defecto septal atrial.

Resumen. Los defectos cardiacos conforman las malformaciones congénitas más frecuentes, con una incidencia que se ha estimado entre 4 y 12 por 1000 en recién nacidos vivos. Estos tienen una etiología multifactorial en la que convergen la predisposición genética y los factores ambientales. A partir de 1990 se ha relacionado este tipo de patologías con microdelección 22q11. Se determinó la frecuencia de la microdelección 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita no sindrómica. Se analizaron 61 pacientes con cardiopatía congénita, a partir de ADN de sangre periférica y posterior amplificación, mediante PCR multiplex del gen *TUPLE1* y del STR *D10S2198*, visualización electroforesis en geles de agarosa y análisis densitométrico para determinar dosis génica. Se encontraron 3 pacientes con microdelección 22q11, para una frecuencia de 4,9%. Esta microdelección se asoció en dos de los casos a Tetralogía de Fallot y en el otro a Defecto Septal Atrial (DSA). En conclusión, la frecuencia de microdelección 22q11 en la población analizada es de 4,9%. Dentro de los casos de Tetralogía de Fallot, la microdelección estaba presente en el 7,4% y en los DSA corresponde al 11,1%.

Analysis of microdeletions in 22q11 in Colombian patients with congenital heart disease.

Invest Clin 2011; 52(4): 334 - 343

Keywords: congenital heart diseases, microdeletion 22q11, multiplex PCR, densitometry, TUPLE 1, Tetralogy of Fallot, atrial septal defects.

Abstract. Cardiac defects are the most frequent congenital malformations, with an incidence estimated between 4 and 12 per 1000 newborns. Their etiology is multifactorial and might be attributed to genetic predispositions and environmental factors. Since 1990 these types of pathologies have been associated with 22q11 microdeletion. In this study, the frequency of microdeletion 22q11 was determined in 61 patients with non-syndromic congenital heart disease. DNA was extracted from peripheral blood and TUPLE1 and STR D10S2198 genes were amplified by multiplex PCR and visualized in agarose gels. Gene content was quantified by densitometry. Three patients were found with microdeletion 22q11, representing a 4.9% frequency. This microdeletion was associated with two cases of Tetralogy of Fallot and a third case with atrial septal defect (ASD). In conclusion, the frequency for microdeletion 22q11 in the population analyzed was 4.9%. The cases that presented Tetralogy of Fallot had a frequency for this microdeletion of 7.4% and for ASD of 11.1%.

Recibido: 10-10-2010. Aceptado: 14-07-2011

INTRODUCCIÓN

Los defectos cardíacos conforman las malformaciones congénitas más frecuentes, con una incidencia que se ha estimado entre 4 y 12 por 1000 en recién nacidos vivos (1, 2), y mucho más alta en los nacidos muertos (3). En la mayoría de las ocasiones se desconoce la etiología de la cardiopatía. Alrededor de un 10% de los casos se asocia a anomalías cromosómicas (numéricas o estructurales) (1). Alrededor del 2-3% puede ser causada por factores ambientales, enfermedades maternas crónicas o esporádicas y por teratógenos (infecciones o sustancias químicas) (4). La mayor parte (80-85%) tiene un origen genético, mendeliano o multifactorial (5).

La prevalencia de la delección 22q11 en nacidos vivos ha sido estimada en 1 en 4000

(6). En la mayoría de los casos, esta microdelección se debe a mutaciones de novo en una menor proporción, puede ser heredada de uno de sus padres, con características como penetrancia incompleta y expresividad variable, que deben ser tenidas en cuenta para el asesoramiento genético de la familia del afectado (4). La alta tasa de recurrencia de estas mutaciones se relaciona con la presencia de la baja copia de secuencias repetidas, que predisponen a un reordenamiento estructural de la región 22q11.2 (7, 8).

Entre el 70 y el 95% de los niños con delección 22q11.2 (9-11) presentan defectos cardíacos y usualmente corresponden a defectos cardíacos conotruncuales, producto de anomalías en los procesos de septación aórtico-pulmonares, y representan entre el 25 y el 30% de los defectos cardíacos

congénitos no sindrómicos (12). Estos defectos cardíacos incluyen la Tetralogía de Fallot, defectos septales ventriculares con atresia pulmonar, tronco arterioso persistente y arco aórtico interrumpido. Otros tipos de cardiopatías como los defectos septales atriales, la coartación aórtica, el canal atrioventricular, la heterotaxia, también han sido asociadas con esta microdeleción (10-18). Lo anterior denota la importancia del análisis de la microdeleción en pacientes con este tipo de cardiopatías. El estudio de la microdeleción 22q11 es también primordial en pacientes adultos con tetralogía de Fallot. Van Engelen y cols demostraron que en un grupo de pacientes adultos con este defecto, la microdeleción afectó al 6,5% de la población. Este dato es relevante e indica que esta determinación debe hacerse no sólo en niños, como es usualmente realizado (19).

Esta microdeleción también ha sido asociada con una gran variabilidad de manifestaciones fenotípicas que incluyen el síndrome DiGeorge, síndrome velo-cardio-facial, síndrome cara y defecto conotruncal, así como a defectos cardíacos aislados (20-25). Estos síndromes han sido agrupados como síndrome de deleción en cromosoma 22q11 o síndrome CATCH 22, por las siglas en inglés de defectos cardíacos, anomalías en cara, hipoplasia tímica, paladar hendido e hipocalcemia (25-20). Estudios recientes han indicado que la microdeleción 22q11.2, además, de relacionarse con el desarrollo de defectos cardíacos, también está involucrada en la etiología de daños psicológicos y cognitivos (26).

El diagnóstico de la microdeleción usualmente se realiza mediante la técnica FISH, la cual a pesar de su alta especificidad y sensibilidad, puede ser relativamente costosa y de acceso limitado, principalmente por la conservación óptima de la muestra para este análisis. Dado que las tecnologías de Biología Molecular son accesibles, eco-

nómicas, altamente sensibles y específicas, este estudio pretendió implementar una estrategia alternativa, específicamente PCR múltiplex para determinar la frecuencia de la microdeleción 22q11.2 en pacientes con Cardiopatía congénita y constituye el primer estudio desarrollado en Colombia para este tipo de defectos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 61 pacientes, atendidos durante los años 2008-2009, con diagnóstico clínico de cardiopatía congénita no sindrómica, por un grupo de expertos en cirugía cardiovascular, cardiología y genética de Bogotá-Colombia. En este estudio se excluyeron pacientes con síndrome de Down, síndromes genéticos relacionados con cardiopatías y antecedentes familiares de cardiopatía congénita y se incluyeron pacientes con cardiopatía congénita no sindrómica, con fenotipo normal. El proyecto fue aprobado por el Comité de ética de la Clínica Shaio y Pontificia Universidad Javeriana.

Previo diligenciamiento de consentimiento informado, se realizó a los pacientes exámenes médicos de rutina como cateterismo, electrocardiograma, cateterismo cardíaco, radiografía de tórax, y estudios complementarios para descartar anomalías extracardiacas. Una vez efectuados estos exámenes, se obtuvo una muestra de sangre periférica para posterior extracción de ADN, por medio de la técnica de *salting out* (27).

Se realizó amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiplex del gen *TUPLE1*, ubicado en la región crítica del CATCH22 y el STR *D10S2198*, localizado en el cromosoma 10, este último sirvió como control interno de amplificación. Utilizando la información consignada en la página WEB del NCBI, se seleccionaron los primeros específicos para la amplificación de los genes *TUPLE1* y el microsatélite *D10S2198*. La secuencia fue re-

visada en el programa BLAST, verificándose la amplificación específica de los segmentos sobre el cromosoma 22 humano: *TUPLE1* F: ACAAGTGACCAATGTCCAAGTG; R: AAGGAAAGCTGTTCCAACACA), y para el microsatélite *D10S2198*: F: TTAACAAGCACA CGACTGGG, y R: TTTAAGGAAAAGGCAA AGTTCG.

Las amplificaciones fueron estandarizadas bajo las siguientes condiciones: Buffer 1X, primers 1.6 μ M, DNTP's 0,2 mM, MgCl₂ 2,0 mM, Taq 1 U/ μ L y ADN 40 ng/ μ L. Las reacciones de amplificación fueron: 94°C por 7 minutos para denaturación inicial, 35 ciclos de 94°C por un minuto, anillado por 1 minuto a 55°C, extensión a 72°C por un minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos. El producto amplificado esperado correspondía a 124pb en el gen *TUPLE1* y 252pb para el microsatélite *D10S198*.

Los productos amplificados fueron corridos en un gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio. La determinación de la dosis génica se realizó mediante evaluación densitométrica. Para todas las amplificaciones se utilizó como control posi-

vo un paciente con microdelección 22q11.2, detectada por FISH.

RESULTADOS

De los 61 pacientes no relacionados, con cardiopatía congénita no sindrómica que participaron del estudio, 31 eran de sexo femenino y 30 de sexo masculino, con un rango etario de 1 día a 29 años y con una mediana de 2 años, promedio de 5 años; además, también participó un paciente de 20 años. En los pacientes analizados, 3 presentaron microdelección 22q11.2, en el 44,3% tenía diagnóstico de Tetralogía de Fallot, mientras el 14,7% correspondió a defectos septales atriales (Tabla I). En el primer grupo, se evidenció la microdelección 22q11.2 en 2 pacientes, lo que correspondió al 7,4% de los casos. Para el segundo grupo, solo 1 paciente presentó la anomalía, lo que determinó una frecuencia de 11,1% (Fig. 1). La frecuencia de la microdelección dentro de las cardiopatías congénitas analizadas fue del 4,9%.

El análisis de la presencia de la delección 22q11.2 fue realizado en los padres de

TABLA I
DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN EL TIPO DE CARDIOPATÍA

Tipo de cardiopatía	n	(%)	Sexo		N (%) Microdelección
			F	M	
Defecto Septal Ventricular	9	(14,75)	5	4	0 (0%)
Defecto Septal Atrial	9	(14,75)	7	2	1 (14,7%)
Comunicación Atrioventricular	2	(3,28)	2		0 (0%)
Transposición de Grandes Vasos	1	(1,64)		1	0 (0%)
Interrupción del Arco Aórtico	1	(1,64)		1	0 (0%)
Coartación de la aorta	8	(13,11)	2	6	0 (0%)
Membrana subaórtica	1	(1,64)		1	0 (0%)
Tetralogía de Fallot	27	(44,26)	12	15	2 (44,3%)
Insuficiencia mitral	1	(1,64)	1		0 (0%)
Drenaje venoso anómalo	1	(1,64)	1		0 (0%)
<i>Truncus arterioso</i>	1	(1,64)	1		0 (0%)

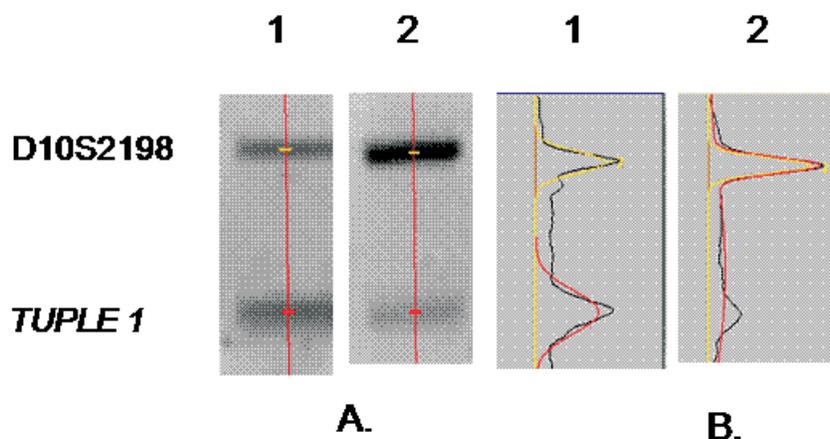


Fig. 1. PCR Multiplex del gen TUPLE 1 y D10S2198 (A). Análisis densitométrico del gel de PCR (B). Carril 1 corresponde a un Control Normal. Carril 2 Paciente con microdelección 22q11.

uno de los casos, en el que se encontró que el papá era el portador de la microdelección. En los casos restantes, no fue posible analizar a los padres.

DISCUSIÓN

Los defectos congénitos del corazón se encuentran dentro de las manifestaciones más comunes de la microdelección 22q11.2 (28, 20); se presentan en la mayoría de los pacientes con síndrome DiGeorge, síndrome Velo-cardio-facial, síndrome cara y defecto conotruncal, lo que sugiere tales entidades representan un espectro en el fenotipo expresado para la delección (14). Sin embargo, la microdelección 22q11 ha sido encontrada incluso en personas que aparentemente, no cursan con alteraciones del nivel cardíaco (29), como en el caso del padre analizado, y que resalta la importancia de implementar un diagnóstico para una consejería genética oportuna.

Los patrones específicos de malformaciones cardiovasculares observados en pacientes con delección 22q11, incluyen: Tetralogía de Fallot, Tetralogía de Fallot con atresia pulmonar, *truncus arteriosus*, arco aórtico interrumpido, defectos del *septum infundibular* y malformaciones de las válvulas semilunares, pero prácticamente todos

los defectos cardíacos congénitos han sido asociados, en mayor o menor proporción, a delecciones en 22q11.2 (30, 17).

La frecuencia de la delección entre los pacientes con cardiopatía conotruncal aislada es en promedio de un 10% (31, 32), mucho menor que la frecuencia de esta entre los pacientes con cardiopatía asociada a otros fenotipos incluidos en el CATCH22, en el que los porcentajes oscilan entre el 80 y el 90% de los casos (33-35). La frecuencia de la microdelección en pacientes con cardiopatía congénita encontrada en nuestro estudio fue del 4,9%. Esto confirma hallazgos previos reportados por otros grupos, en los que las frecuencias oscilaban entre el 4,2 y el 13% (36-39), lo que demuestra que la delección 22q11 representa la causa conocida más común de Tetralogía de Fallot y supera, incluso, a la trisomía 21.

Particularmente, en los pacientes con Tetralogía de Fallot se han encontrado frecuencias de delecciones que oscilan entre el 3,1 y el 82%, siendo ésta una de las patologías cardíacas habitualmente asociadas a esta microdelección (40-42).

En el presente estudio se identificó la microdelección en el 7,4% de los pacientes con Tetralogía de Fallot. Las frecuencias superiores encontradas por otros grupos pueden ser secundarias a la metodología utili-

zada en algunos de ellos (40), donde emplean hasta 11 microsatélites ubicados en la región 22q11. Esta metodología permite reconocer deleciones más pequeñas que no pueden ser identificadas con FISH o con el empleo de pocos marcadores.

Adicionalmente, en los pacientes analizados, se identificó dentro de los defectos septales atriales, un caso de microdeleción (11,1%); este tipo de alteraciones generalmente han sido asociadas, en un bajo porcentaje (0-0,8%), a la presencia de la microdeleción (39, 43). Sin embargo, la frecuencia relativamente alta encontrada en el presente trabajo, es debido a que solo fueron analizados nueve pacientes con este tipo de defectos. Otros autores han reportado frecuencias incluso mayores a las encontradas en este estudio (25%) (44). Los hallazgos en este estudio justifican la realización de este tipo de pruebas en pacientes con defectos cardíacos, particularmente conotruncales, como parte fundamental del establecimiento de la etiología de la enfermedad, aún en aquellos pacientes que sólo tienen defectos cardíacos aislados y que no presentan un fenotipo sugestivo de CATCH22, ya que la ausencia de estos hallazgos ha llevado al subdiagnóstico de la microdeleción, incluso en pacientes adultos (19, 45).

Adicionalmente, se ha documentado que los pacientes que cursan con defectos septales ventriculares y arco aórtico interrumpido, asociados con la presencia de microdeleciones en 22q11.2, tienen un riesgo mayor de complicaciones quirúrgicas que los pacientes con Tetralogía de Fallot con o sin atresia pulmonar y microdeleciones 22q11.2, en los cuales no se afecta el pronóstico quirúrgico. La identificación de factores de riesgo, como la presencia de la microdeleción, se considera fundamental para proveer un apropiado tratamiento encaminado a reducir la mortalidad peri operatoria de estos pacientes (46).

Otro punto importante para resaltar en este trabajo es el origen paterno de la microdeleción en el caso positivo, la literatura reporta un origen maternal preferencial de la deleción 22q11. Esta herencia materna se produce en dos terceras partes de los casos familiares, lo que da lugar a que se formulen algunas hipótesis: 1) fertilidad disminuida en los padres portadores de la deleción 22q11, 2) mujeres portadoras tienen una mayor posibilidad de transmitir el alelo mutado a sus hijos (13-21). De igual manera, se han reportado casos de transmisión paterna de la microdeleción (47).

Existen pocos reportes que hayan caracterizado el fenotipo de la microdeleción en adultos. Se ha documentado que presentan tasas más altas de problemas de aprendizaje, trastornos psiquiátricos y anomalías en el paladar, pero frecuencias menores de cardiopatía cuando se comparan con los niños (9-46-48). Sin embargo, estos hallazgos resaltan la importancia de identificar los pacientes que porten la microdeleción, con el objeto de buscar estos cuadros asociados e intervenirlos oportunamente.

Sobre la metodología empleada en el presente trabajo, resulta significativo analizar las ventajas de usar PCR en lugar de FISH, esta última, además de ser relativamente costosa y requerir equipos especiales, necesita que la muestra sea mantenida en condiciones especiales que permitan la viabilidad celular una técnica considerada indispensable para mantener las muestras frescas, mientras que la PCR Múltiple es más flexible al manejo y almacenamiento que se le dé, ya que un ADN de alta pureza puede ser conservado por varios años. En cuanto al tamaño de las regiones de análisis, El FISH utiliza sondas marcadas que permiten la identificación de deleciones o duplicaciones dependientes del tamaño de esta, mientras que mediante la determinación de varios STRs por PCR Múltiple y

análisis densitométrico se pueden identificar zonas más pequeñas. Esta metodología, al igual que otras de reciente aparición como la Hibridación genómica Comparativa de Alta resolución y la PCR cuantitativa, permiten además de determinar los puntos de ruptura realizar análisis de segregación (49).

De otro lado, resulta primordial implementar el diagnóstico de esta microdelección como una prueba de rutina, incluso en ausencia de hallazgos fenotípicos sugestivos de la patología, para ofrecer una asesoría genética adecuada, porque si el paciente es portador de la microdelección, va a tener un riesgo del 50% de heredarla a sus hijos, a diferencia del probable 5% de riesgo que tienen las cardiopatías congénitas por tratarse de enfermedades multifactoriales.

En conclusión, la frecuencia de microdelección 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita no sindrómica representa el 4,9%. Dentro de los casos de tetralogía de Fallot, la frecuencia de la microdelección constituye el 7,4% y, en relación con el defecto septal atrial corresponde al 11,1%. Estas frecuencias requieren la necesidad de implementar herramientas diagnósticas para tratamientos tempranos.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Clínica Shaio, Fundación Cardio-Infantil, Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Universidad del Rosario. A todos los pacientes que participaron del estudio. Este proyecto fue financiado por la Universidad del Rosario.

REFERENCIAS

1. **Ferenz C, Neill CA, Boughman JA, Rubin JD, Brenner JI, Perry LW.** Congenital cardiovascular malformations associated with chromosomal abnormalities: an epidemiologic study. *J Pediatr* 1998; 114:79-86.
2. **Díaz Tomás JJ, Borreiro J, Ramos A, Solís G, Crespo M.** Cardiopatías congénitas en una serie de 53578 niños nacidos en Oviedo (1976-1985). *An Esp Pediatr* 1989; 31:229-32.
3. **Hoffman JI, Kaplan S, Liberhson RR.** Prevalence of congenital heart disease. *Am Heart J* 2004; 147: 425-439.
4. **Botto, Lorenzo D, May, Kristin, Fernhoff, Paul MA.** Population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics* 2003; 112:101-107.
5. **Icardo J.** Malformaciones cardíacas, heterotaxia y lateralidad. *Rev Esp Cardiol* 2002; 9: 962-974.
6. **Glover TW.** CATCHing a break on 22. *Nat Genet* 1995; 3:257-258.
7. **Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE.** Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardiofacial syndrome. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1076-1086.
8. **Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS.** Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med* 2001; 3: 6-13.
9. **Fokstuen S, Artan S, Dutly F, Brecevic L, Fasnacht M, Röthlisberger B, Schinzel A.** 22q11.2 deletions in a series of patients with non-selective congenital heart defects: incidence, type of defects and parental origin. *Clin Genet* 1998; 53:63-69.
10. **McDonald-McGinn DM, LaRossa D, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Wang P, Solot C, Schultz P, Lynch D, Bingham P, Keenan G, Weinzimer S, Ming JE, Driscoll D, Clark BJ 3rd, Markowitz R, Cohen A, Moshang T, Pasquariello P, Randall P, Emanuel BS, Zackai EH.** The 22q11.2 deletion: screening, diagnostic workup, and outcome of results; report on 181 patients. *Genet Test* 1997; 1:99-108.
11. **Shprintzen RJ, Higgins AM, Antshel K, Fremont W, Roizen N, Kates W.** Velo-cardio-facial syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2005; 17:725-730.

12. **Debrus S, Berger G, de Meeus A, Sauer U, Guillaumont S, Voisin M, Bozio A, Demezuk S, Aurias A, Bouvañnet P.** Familial non-syndromic conotruncal defects are not associated with a 22q11 microdeletion. *Hum Genet* 1996; 97:138-144.
13. **Ryan AK.** Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 1997; 54: 798-801.
14. **Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AE, Cuneo BF, Reed L.** Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:492-498.
15. **Anaclerio, S.** Conotruncal heart defects: impact of genetic syndromes on immediate operative mortality. *Ital Heart J* 2004; 5(8): 624-628.
16. **Braunw AL.** Tratado de Cardiología. Editorial Mc Graw Hill. México. 2000, Quinta Ed., Vol. I y II. Capítulos 29-49.
17. **Iserin L, de Lonlay P, Viot G, Sidi D, Kachaner J, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M, Bonnet D.** Prevalence of the microdeletion 22q11 in newborn infants with congenital conotruncal cardiac anomalies. *Eur J Pediatr* 1998; 157:881-884.
18. **Marino B, Digilio MC, Toscano A, Anaclerio S, Giannotti A, Feltri C, de Ioris MA, Angioni A, Dallapiccola B.** Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genet Med* 2001; 3(1):45-48.
19. **Kazuma N, Murakami M, Suzuki Y, Umezu R, Murata M.** Cervical aortic arch associated with 22q11.2 deletion. *Pediatr Cardiol* 1997; 18:149-151.
20. **van Engelen K, Topf A, Keavney BD, Goodship JA, van der Velde ET, Baars MJ, Snijder S, Moorman AF, Postma AV, Mulder BJ.** 22q11.2 Deletion Syndrome is under-recognized in adult patients with Tetralogy of Fallot and pulmonary atresia. *Heart* 2010; 96(8):621-624.
21. **Burn J, Takao A, Wilson D, Cross I, Momma K, Wadey R, Scambler P, Goodship J.J.** Med Genet. Conotruncal anomaly face syndrome is associated with a deletion within chromosome 22q11. *J Med Genet* 1993; 30:822-824.
22. **Driscoll DA.** Prevalence of 22q11 microdeletions in DGS and VCFS: implications for genetic counseling and prenatal diagnosis. *J Med Genet* 1993. 30: 813-817.
23. **Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, Shprintzen RJ, Saal HM, Zonana J, Jones MC, et al.** Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* 1992; 44:261-268.
24. **Jedele KB, Michels VV, Puğa FJ, Feldt RH.** Velo-cardio-facial syndrome associated with ventricular septal defect, pulmonary atresia, and hypoplastic pulmonary arteries. *Pediatrics* 1992; 89:915-919.
25. **Johnson MC, Watson MS, Strauss AW.** Chromosome 22q11 monosomy and the genetic basis of congenital heart disease. *J Pediatr* 1996; 129: 1-3.
26. **Wilson DI, Bum J, Scambler P, Goodship J.** DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet* 1993; 30: 852-856.
27. **Karayorgou M, Simon TJ, Gogos JA.** 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11(6):402-416.
28. **Miller CF, Lurye LE, Zosuls KM, Ruble DN.** Accessibility of gender stereotype domains: developmental and gender differences in children. *Sex Roles* 2009; 60: 870-881.
29. **Amati F, Mari A, Digilio MC, Mingarelli R, Marino B, Giannotti A, Novelli G, Dallapiccola B.** 22q11 deletions in isolated and syndromic patients with tetralogy of Fallot. *Hum Genet* 1995; 95: 479-482.
30. **Motzkin B, Marion R, Goldberg R, Shprintzen R, Saenger P.** Variable phenotypes in velocardiofacial syndrome with chromosomal deletion. *J Pediatr* 1993; 123: 406-410.
31. **Momma K.** Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Cardiol* 2010; 105: 1617-1624.
32. **Lammer EJ, Chak JS, Iovannisci DM, Schultz K, Osoegawa K, Yang W, Carmichael SL, Shaw GM.** Chromosomal

- abnormalities among children born with conotruncal cardiac defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85:30-35.
33. **McElhinney DB, Driscoll DA, Levin ER, Jawad AF, Emanuel BS, Goldmuntz E.** Chromosome 22q11 deletion in patients with ventricular septal defect: frequency and associated cardiovascular anomalies. *Pediatrics* 2003; 112(6 Pt 1):e472.
 34. **Matsuoka R, Kimura M, Scambler PJ, Morrow BE, Imamura S, Minoshima S, Shimizu N, Yamagishi H, Joh-o K, Watanabe S, Oyama K, Saji T, Ando M, Takao A, Momma K.** Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Hum Genet* 1998; 103:70-80.
 35. **Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, Shprintzen RJ, Saal HM, Zonana J, Jones MC.** Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* 1992; 44:261-268.
 36. **Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, Wilson DI, Goodship JA, Cross IE, Burn J.** Velocardiofacial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet*. 1992; 339: 1138-1139.
 37. **Shen L, Xu YJ, Zhao PJ, Sun K.** Frequency of 22q11 deletions in children with isolated conotruncal defects. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2009; 11:25-28.
 38. **Aglony I M, Lizama CM, Méndez RC, Navarrete SC, Garay GF, Repetto LG, Pérez LR, Carrión AF, Talesnik GE** Clinical findings and immunologic variability in 9 patients with DiGeorge síndrome. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 26-32.
 39. **Ziolkowska L, Kawalec W, Turska-Kmiec A, Krajewska-Walasek M, Brzezinska-Rajszys G, Daszkowska J, Maruszewski B, Bureczynski P.** Chromosome 22q11.2 microdeletion in children with conotruncal heart defects: frequency, associated cardiovascular anomalies, and outcome following cardiac surgery. *Eur J Pediatr* 2008; 167:1135-1140.
 40. **Rauch R, Hofbeck M, Zweier C, Koch A, Zink S, Trautmann U, Hoyer J, Kaulitz R, Singer H, Rauch A.** Comprehensive genotype-phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot. *J Med Genet*. 2010; 47(5):321-331.
 41. **Khositseth A, Tocharoentanaphol C, Khowsathit P, Ruangdaraganon N.** Chromosome 22q11 deletions in patients with conotruncal heart defects. *Pediatr Cardiol* 2005; 26:570-573.
 42. **Jiang L, Duan C, Chen B, Hou Z, Chen Z, Li Y, Huan Y, Wu KK.** Association of 22q11 deletion with isolated congenital heart disease in three Chinese ethnic groups. *Int J Cardiol* 2005; 105:216-223.
 43. **Momma K, Kondo C, Matsuoka R.** Tetralogy of Fallot with pulmonary atresia associated with chromosome 22q11 deletion. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:198-202.
 44. **Hu Y, Zhu X, Yang Y, Mo X, Sheng M, Yao J, Wang D.** Incidences of micro-deletion/duplication 22q11.2 detected by multiplex ligation-dependent probe amplification in patients with congenital cardiac disease who are scheduled for cardiac surgery. *Cardiol Young* 2009; 19:179-184.
 45. **Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, Xavier-Neto J, Lopes AA, Krieger JE.** NKX2.5 mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease. *Int J Cardiol* 2010; 138:261-265.
 46. **Beauchesne LM, Warnes CA, Connolly HM, Ammash NM, Grogan M, Jalal SM, Michels VV.** Prevalence and clinical manifestations of 22q11.2 microdeletion in adults with selected conotruncal anomalies. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:595-598
 47. **Carotti A, Digilio MC, Piacentini G, Saffirio C, Di Donato RM, Marino B.** Cardiac defects and results of cardiac surgery in 22q11.2 deletion syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 2008; 14(1):35-42.
 48. **Garcia-Miñaur S, Fantes J, Murray RS, Porteous ME, Strain L, Burns JE, Stephen J, Warner JP.** A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *J Med Genet* 2002; 39:62.
 49. **Cohen E, Chow EWC, Weksberg R, Basett AS.** Phenotype of adults with the

- 22q11 deletion syndrome: a review. *Am J Med Genet.* 1999; 86:359-365.
50. **Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, Burgüeros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M, García-Alix A, Delicado A.** Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet* 2005; 68:373-378.