



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN
PTPN11 EN PACIENTES MEXICANOS
CON SÍNDROME DE NOONAN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Norma Celia González Huerta

DIRECTOR DE TESIS: Dr. en C. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias.

MÉXICO, D. F.

JUNIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

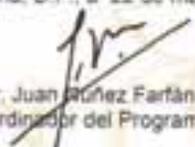
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de marzo 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna GONZÁLEZ HUERTA NORMA CELIA con número de cuenta 89592298 con la tesis titulada "ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN PTPN11 EN PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE NOONAN", realizada bajo la dirección del DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS:

Presidente: DR. FABIO ABDEL SLAMANCA GÓMEZ
Vocal: DRA. MARTHA ALICIA MENJIVAR IRAHETA
Secretario: DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
Suplente: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALA
Suplente: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de mayo de 2009.


Dr. Juan Gómez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

◆ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

◆ Al apoyo recibido por PAPIIT (IN204508)

◆ A los miembros de comité tutorial por su apoyo y orientación durante el desarrollo de este trabajo:

Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias.

Hospital General de México, Servicio de Genética, Secretaría de Salud.

Dra. Martha Alicia Menjivar Iraheta.

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta.

Hospital General de México, Servicio de Hematología, Secretaría de Salud.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Síndrome de Noonan.....	1
1.2 Gen <i>PTPN11</i>	5
1.3 Proteína fosfatasa de la tirosina SH2 (SHP-2).....	5
1.4 Mutaciones en el gen <i>PTPN11</i>	7
1.5 Relación fenotipo-genotipo.....	11
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	14
III. OBJETIVO.....	15
3.1. Objetivo General.....	15
3.2. Objetivos Específicos	15
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	16
4.1 DISEÑO Y VARIABLES.....	16
4.2 DIAGRAMA DE FLUJO.....	17
V MÉTODOS.....	18
VI RESULTADOS.....	25
Caso familiar A.....	26
Caso familiar B.....	27
Caso esporádico C.....	29
Caso esporádico D.....	30

Caso esporádico E.....	31
Caso esporádico F.....	32
Electroforesis.....	33
Electroferograma del caso familiar B.....	34
Ultrasonido del caso familiar B (III-1)	35
VII DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
VII CONCLUSIONES.....	42
IX REFERENCIAS.....	43
X ANEXOS.....	48
Anexo 1. Carta de consentimiento (Paciente).....	48
Carta de consentimiento (Control).....	49
Anexo 2. Extracción ADN.....	50
Anexo 3. Análisis espectrofotométrico de ADN.....	51
Anexo 4. Electroforesis horizontal.....	52
Anexo 5. PCR.....	54
Anexo 6. PCR para secuenciación.....	57
Anexo 7. Purificación del productos para secuenciación.....	59
Anexo 8. Secuenciación automatizada.....	60
Anexo 9 Código genético	61
Anexo 10. Símbolos de los aminoácido.....	62
XI TABLAS (5-7).....	63
Tabla 5. Reactivos.....	63

Tabla 6. Equipos..... 65

Tabla 7. Oligonucleótidos..... 66

RESUMEN

El síndrome de Noonan (SN) es considerado un desorden autosómico dominante clínicamente heterogéneo caracterizado por talla baja, dismorfias faciales y amplio espectro de defectos cardíacos presentes al nacimiento. El diagnóstico de SN se realiza clínicamente, aunque esto puede ser muy difícil debido a que se presenta una gran variabilidad en la expresión fenotípica. Aproximadamente 50% de los pacientes con SN presentan mutaciones de sentido equivocado en el gen proteína fosfatasa de la tirosina no receptora tipo 11 (*PTPN11*), el cual codifica para la proteína fosfatasa de la tirosina SH2 (SHP-2). El objetivo del presente estudio fue el análisis molecular del gen *PTPN11* en una muestra de 6 pacientes mexicanos no relacionados, mediante la secuenciación de ADN correspondiente a 15 exones que constituyen el gen *PTPN11*. Se identificó una mutación en el exón 3 (Q79R) en un caso familiar, en el resto de los pacientes no fue posible caracterizar mutación en el gen *PTPN11*, por lo cual es necesario explorar posibles mutaciones en otros genes involucrados en SN.

ABSTRACT.

Noonan syndrome (NS) is an autosomal dominant disorder clinically heterogeneous characterized by short stature, facial dysmorphism and a wide spectrum of cardiac defects present at birth. The diagnosis is made clinically, although this can be very difficult because it presents a great variability in phenotypic expression. Missense mutations in protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11 (*PTPN11*) gene had been found to account for nearly 50% of NS. *PTPN11* gene encodes protein tyrosine phosphatase SH2 (SHP-2). The aim of this study was to analyze molecularly the *PTPN11* gene in a sample of 6 Mexican non-related patients. 15 exons of the *PTPN11* gene was analyzed through direct sequencing DNA analysis from genomic DNA. We identified a mutation in exon 3 (Q79R) in one family case. In 5 patients unrelated with NS, it was not possible to characterize any mutation in the gene *PTPN11*, it is necessary to explore other genes involved in NS.

I. ANTECEDENTES

1.1 SÍNDROMES DE NOONAN.

El Síndrome de Noonan (SN), descrito en 1968, es considerado un desorden autosómico dominante con un amplio espectro de expresiones fenotípicas. Se estima que su frecuencia de aparición es entre 1:1,000 y 1:2,500 nacidos vivos (1,2,3,4), siendo aproximadamente el 50% de los casos esporádicos (5). El SN es clínicamente heterogéneo. En el cuadro 1 se muestran algunas de las características fenotípicas presentes en pacientes afectados, siendo las principales características estatura corta proporcional, presente en 70% de los casos, alteraciones cardiacas en el 90% de los afectados, siendo las más comunes estenosis pulmonar y cardiomiopatía obstructiva hipertrófica (HOCM) (2,4). También se han observado alteraciones hematológicas, incluyendo leucemia mielomonocítica juvenil (JMML), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y leucemia mieloide aguda (AML) (6).

El SN tiene un fenotipo similar al síndrome de Turner, pero el estudio citogenético muestra un cariotipo normal (46XY o 46XX) lo cual permitió distinguir entre el síndrome de Turner y de Noonan (7).

El diagnóstico puede ser difícil especialmente en edad adulta, debido a que hay una gran variabilidad en la expresión y el fenotipo puede ser menos pronunciado

Cuadro 1. Características clínicas en síndrome de Noonan.

Facies típicas
Facies triangular
Frente prominente
Hipertelorismo
Pliegue epicántico
Ptosis palpebral
Estrabismo
Cuello
Corto
Ptergión
<i>Pterigium colli</i>
Baja implantación de la línea del pelo
Estatura corta
Pabellones auriculares de implantación baja y mal delineados
Mala oclusión dental
Micrognatia
Anormalidades en la pigmentación de la piel
Esqueleto
<i>Pectus excavatum o carinatum</i>
Cubitus valgus
Escoliosis
Anormalidad vertebral
Pérdida de la audición
Anomalías cardíacas
Estenosis de la válvula pulmonar
Cardiomiopatía hipertrófica
Criptorquidia
Unilateral
Bilateral
Retraso mental
Pubertad retrasada
Hematología
Leucemia mielomonocítica juvenil
Leucemia linfoblástica aguda
Leucemia mieloide aguda
Trombocitopenia
Alteraciones en el sistema de coagulación (enfermedad von Willebrand, deficiencia factor XI y XII)
Oftalmología
Miopía
Linfedema

Tomada de: Guízar V. 1999⁽⁸⁾; Tartaglia M y cols. 2002⁽²⁾; van der Burgt I 2007⁽⁹⁾; Tartaglia M y cols. 2005⁽¹⁰⁾.

ANTECEDENTES

al incrementar la edad (ver figura 1). Varios sistemas de puntuación han sido ideados para sustentar el diagnóstico, el más reciente se presenta en el cuadro 2 (9).

El diagnóstico del SN depende primariamente de las características clínicas, esto es basado principalmente en las dismorfias faciales, la estatura corta y los defectos congénitos del corazón (10,11).



Figura 1. Se muestra la evolución de las características faciales en una niña afectada con SN, de los 2 a 17 años.

Tomada de: Tartaglia M y Gelb BD, 2005⁽¹⁰⁾

Cuadro 2. Sistema de puntuación para el síndrome de Noonan.

Característica	A= Mayor	B= Menor
Facial	Facies característica típica	Facies sugestiva de SN
Cardíaca	Estenosis valvular pulmonar HOCM y/o EGC típico SN	
Talla	<P3	<P10
Tórax	<i>Pectus carinatum/excavatum</i>	Tórax ancho
Historia familiar	Familiar con SN	Familiar con SN sugestivo
Otros	Retardo mental, criptorquidia displasia linfática juntos	Retardo mental, criptorquidia displasia linfática aislados.

HOCM cardiomiopatía obstructiva hipertrófica.

*P3 y P10 se refiere a las curvas percentiles para altura acorde a la edad con un rango normal de variación definido como P3-P97 inclusivo.

SN definido: 1 "A" plus un signo mayor o 2 signos menores; 1 "B" plus 2 signos mayores o 3 menores.

Aproximadamente el 50% de los pacientes con SN presentan mutaciones de sentido equivocado en el gen proteína fosfatasa de la tirosina no receptora tipo 11 (*PTPN11*), el cual codifica para la proteína fosfatasa de la tirosina SH2 (SHP-2). Esta mutación genera una ganancia de función originando una excesiva actividad de SHP-2. En el SN, SHP-2 participa en la vía de señalización Ras-Proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (1, 2, 12).

Las mutaciones del gen *PTPN11* no son las únicas relacionadas con el SN. También se han identificado mutaciones en otros genes, *KRAS* y *SOS1*, que

participan en la vía Ras/MAPK. Mutaciones de sentido equivocado en *RAF1* han sido recientemente reportadas afectando del 3 al 17% de pacientes con SN ⁽¹³⁾.

En algunos pacientes se ha reportado duplicación de la región 12q24 ^(13, 14, 15).

1.2. GEN *PTPN11*

El gen *PTPN11* está constituido por 15 exones. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 en la banda 24.1 (12q24.1) y tiene un tamaño aproximado de 87.67 Kb. El transcrito del gen está formado por 2767 pb, codifica para SHP-2 que contiene 593 aminoácidos y está presente en todo tipo de tejidos, tanto embrionario como en adulto. Participa en la regularización de señales de transducción para factores de crecimiento, citocinas y hormonas. SHP-2 se implica en la vía de señalización Ras-MAPK que estimula la proliferación, diferenciación y migración celular ^(1, 10, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

1.3. PROTEÍNA FOSFATASA DE LA TIROSINA SH2 (SHP-2).

SHP-2 es una proteína fosfatasa de la tirosina no transmembranal que contiene 2 dominios con homología-Src (SH2) en la región N-terminal, la cual se expresa en citoplasma en forma ubicua ^(12, 22, 23).

ANTECEDENTES

Esta proteína fosfatasa de la tirosina (PTP) se caracteriza por sus 2 dominios SH2 (N-SH2 Y C-SH2) en tándem en N-terminal, y una cola de C- terminal que contiene una región rica en prolina (18, 22, 24, 25). Ambos dominios SH2 se requieren para la unión a residuos de tirosina fosforilada (26).

La SHP-2 tiene dos conformaciones, una activa y otra inactiva. En su dominio N-SH2 forma un bucle en donde encaja al dominio PTP, como se muestra en la figura 2 (D'E), lo que bloquea su sitio catalítico. El bucle D'E flanquea con las cadenas β D' y β E cerrando esta interacción con la hendidura catalítica, bloqueando así el sitio catalítico de PTP (10). Cuando el dominio SH2 se une con residuos fosfotirosina cambia la conformación en el dominio N-SH2 lo que resulta en la activación de la proteína (21, 27, 28). La unión de aminoácidos en los dominios SH2 da origen a la activación de la proteína, y esta unión se ha denominado “interruptor” molecular (18). La activación de SHP-2 se correlaciona con el estado de fosforilación de receptores de factores de crecimiento. Por consiguiente esto desencadena mecanismos relacionados en la transducción de señales inducidos por factores de crecimiento (29).

SHP-2 regula vías de señalización de varios receptores tirosina cinasa como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y por consiguiente la activación de la cascada Ras/MAPK que estimula la proliferación, diferenciación y migración celular (21).

Las funciones regulatorias de SHP-2 en señalización intracelular es muy compleja. Los mecanismos de acción para SHP-2 y sus substratos fisiológicos no están aún definidos (10, 12, 23).

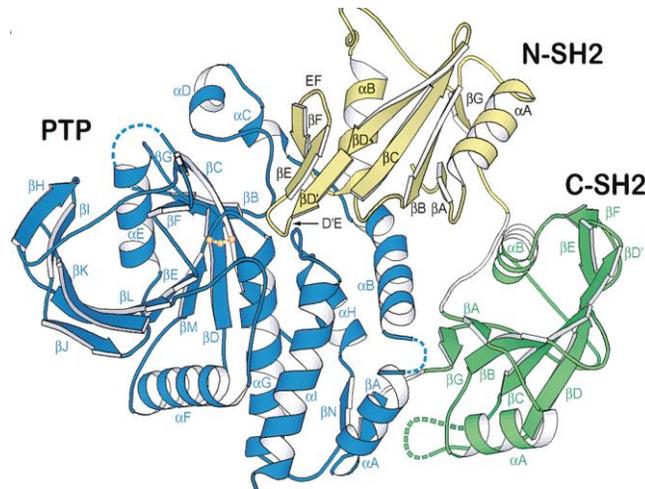


Figura 2. Proteína fosfatasa de la tirosina SH2. Estructura cristalina del dominio SH2 N- y C- terminal están en amarillo y verde respectivamente; el dominio fosfatasa de la tirosina en azul.

Tomada de: Hof y col. 1998 (18)

1.4. MUTACIONES EN EL GEN *PTPN11*

En el gen *PTPN11* se han identificado mutaciones de sentido equivocado en pacientes con fenotipo compatible con el SN (ver tabla 1) (30). Estas mutaciones implican el cambio de un par de bases, dando como resultado en el momento de la expresión el cambio de un aminoácido (1, 31).

También se han identificado microdeleciones de menos de 20 pares de bases (pb) (ver tabla 2) o deleción/inserción en el gen *PTPN11* (ver tabla 3) (30).

ANTECEDENTES

Recientemente se describió una duplicación de la banda cromosómica 12q24.11q24.23 del gen *PTPN11* identificada por ensayo de hibridación genómica comparativa (aCGH) (13).

Tabla 1. Base de datos de mutaciones de sentido equivocado identificadas en el gen *PTPN11* implicadas en el síndrome de Noonan.

NÚMERO DE CODÓN	CODÓN DE CAMBIO	AMINOÁCIDO DE CAMBIO	REFERENCIA
2	ACA-ATA	Thr-Ile	32
42	cACA-GCA	Thr-Ala	2
58	AACa-AAG	Asn-Lys	33
58	gAAC-CAC	Asn-His	4
58	gAAC-GAC	Asn-Asp	34
60	GGT-GCT	Gly-Ala	2
60	tGGT-TGT	Gly-Cys	4
61	GAT-GGT	Asp-Gly	1
61	tGAT-AAT	Asp-Asn	2
62	tTAC-GAC	Tyr-Asp	2
62	tTAC-AAC	Tyr-Asn	24
63	TAT-TGT	Tyr-Cys	1
69	gGAG-CAG	Glu-Gln	33
71	aTTT-CTT	Phe-Leu	33
71	aTTT-ATT	Phe-Ile	35
72	GCC-GCC	Ala-Gly	1
72	tGCC-TCC	Ala-Ser	1

ANTECEDENTES

Tabla 1. (continuación)

NÚMERO DE CODÓN	CODÓN DE CAMBIO	AMINOÁCIDO DE CAMBIO	REFERENCIA
73	ACT-ATT	Thr-Ile	2
76	GAGt-GAC	Glu-Asp	1
79	CAG-CCG	Gln-Pro	32
79	CAG-CGG	Gln-Arg	1
106	GAT-GCT	Asp-Ala	2
110	GAA-GCA	Glu-Ala	34
139	gAGA-GAC	Glu-asp	2
139	gAGA-GAT	Glu-asp	2
256	CAA-CGA	Gln-Arg	33
256	aCAA-AAA	Gln-Lys	36
268	gGGT-TGT	Gly-Cys	24
279	TAT-TGT	Tyr-Cys	2
282	cATC-GTC	Ile-Val	1
285	cTTT-Ctt	Phe-Leu	2
285	TTT-TCT	Phe-Ser	2
285	TTT-TGT	Phe-Cys	24
285	AAT-ACT	Asn-Thr	34
308	aAAT-GAT	Asn-Asp	1
308	AAT-AGT	Asn-Ser	2
308	AAT-ACT	Asn-Thr	34
309	tATC-GTC	Ile-Val	2
411	ACG-ATG	Thr-Met	37
491	tCCC-TCC	Pro-Ser	34

Tabla 1. (continuación)

NÚMERO DE CODÓN	CODÓN DE CAMBIO	AMINOÁCIDO DE CAMBIO	REFERENCIA
491	CCC-CTC	Pro-Leu	36
501	AGG-AAG	Arg-Lys	2
502	gTCA-ACA	Ser-Thr	38
502	gTCA-GCA	Ser-Ala	39
502	TCA-TTA	Ser-Leu	40
503	aGGG-AGG	Gly-Arg	24
503	aGGG-CGG	Gly-Arg	32
504	gATG-GTG	Met-Val	1
510	aCAG-GAG	Gln-Glu	41
510	CAG-CGG	Gln-Arg	42
560	tCTC-TTC	Leu-Phe	32

Tabla 2. Base de datos de microdelección identificada en el gen *PTPN11* implicada en el síndrome de Noonan.

NÚMERO DE CODÓN	DELECIÓN	REFERENCIA
59	CAGAAC^ACTGgtgATTACTATGA	43
60	GAACACT^GGTgatTACTATGACC	44

Tabla 3. Base de datos de deleción/inserción identificada en el gen *PTPN11* implicada en el síndrome de Noonan

NÚMERO DE CODÓN	DELECIÓN	INSERCIÓN	REFERENCIA
59	CAGAAC^ACTGgtgaTTACTATGAC	t	24

De las mutaciones reportadas en SHP-2 aproximadamente 30 de éstas afectan diferentes residuos localizados en los dominios N-SH2 e interacción con PTP (ver figura 3) (28).

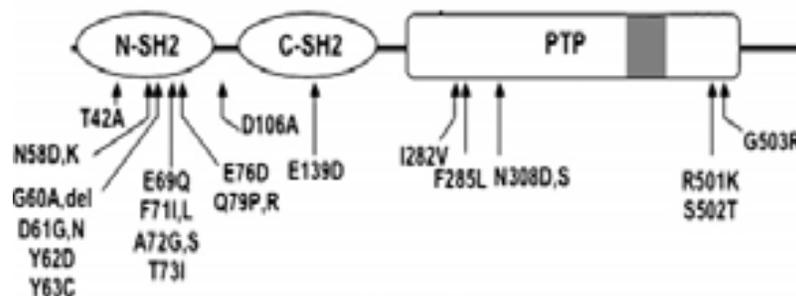


Figura 3. Representación esquemática de la distribución en SHP-2 de algunas mutaciones identificadas en SN.

1.5. RELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

Debido a la heterogeneidad observada en el SN, Tartaglia y colaboradores (cols.) (2) estudiaron la posible asociación entre genotipo y fenotipo. Los resultados que obtuvieron se exponen en la tabla 4, la cual muestra las características clínicas

ANTECEDENTES

más frecuentes en sujetos con y sin mutación en el gen *PTPN11*, en donde hay una asociación estadísticamente significativa entre el grupo que presentó mutación de sentido equivocado en el gen *PTPN11* con los que presentaron estenosis valvular pulmonar o HCM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estos grupos al considerar las siguientes características: defecto septal, estatura corta, retraso mental, deformidad del tórax y criptorquidia. La alta prevalencia de estenosis pulmonar en pacientes portadores de una mutación en el gen *PTPN11* y su correlación inversa con cardiopatía hipertrófica fue también observada por Zenker y cols. ⁽³⁴⁾.

La mutación de sentido equivocado en el gen *PTPN11* origina ganancia de función de SHP-2 lo cual afecta la morfogénesis de la válvula semilunar en ratón y probablemente pueda ser responsable de la estenosis pulmonar observada en algunos pacientes con SN ⁽⁴⁵⁾.

En el presente estudio se realizó el análisis molecular en el gen *PTPN11* en pacientes con diagnóstico clínico de SN.

ANTECEDENTES

Tabla 4. Características clínicas en pacientes con SN con y sin mutación en el gen *PTPN11*.

Característica clínica	Proporción de pacientes con mutación en <i>PTPN11</i> (%)	Proporción de pacientes sin mutación en <i>PTPN11</i> (%)	*P
HCM	3/51 (5.9)	17/65 (26.2)	0.004
Estenosis pulmonar	36/51 (70.6)	30/65 (46.2)	0.008
Defecto septal	6/50 (12.0)	11/63 (17.5)	ns
Estatura corta	39/51 (76.5)	45/64 (70.3)	ns
Retraso mental	11/46 (23.9)	21/59 (35.6)	ns
Deformidad del tórax	39/50 (78.0)	46/61 (75.4)	ns
Criptorquidia	26/31 (83.9)	25/35 (71.4)	ns

*P < 0.05

ns = estadísticamente no significativo

Tomada de: Tartaglia M y cols. 2002 ⁽²⁾

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El SN es un desorden autosómico dominante, el cual se caracteriza por ser clínicamente heterogéneo y esto conlleva a un diagnóstico clínico difícil. De este modo, el asesoramiento genético debe estar basado en un análisis de diagnóstico que permita caracterizar estos pacientes.

En esta enfermedad se han identificado 4 genes implicados (*PTPN11*, *KRAS*, *SOS1* y *RAF1*), de los cuales aproximadamente el 50% de estos pacientes presentan mutación en el gen *PTPN11*, siendo ésta principalmente de sentido equivocado.

Al realizar el análisis molecular del gen *PTPN11* en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de SN será posible tener un diagnóstico más certero para que el paciente reciba un asesoramiento genético adecuado.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis molecular del gen *PTPN11* en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de SN.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la proporción de pacientes con SN debido a defectos en el gen *PTPN11*.
- Caracterizar el tipo de mutaciones encontradas en el gen *PTPN11* en pacientes con SN
- Identificar nuevas mutaciones en el gen *PTPN 11* en el SN.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. DISEÑO Y VARIABLES

TIPO DE ESTUDIO

Transversal, descriptivo.

SELECCIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

Pacientes que acudan a consulta al Hospital General de México en los servicios de Cardiología/Genética.

Diagnóstico clínico de SN, no importa sexo ni edad.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Con diagnóstico clínico de SN

Que acepten participar en el estudio

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Individuos con diagnóstico de SN que no deseen participar en el estudio.

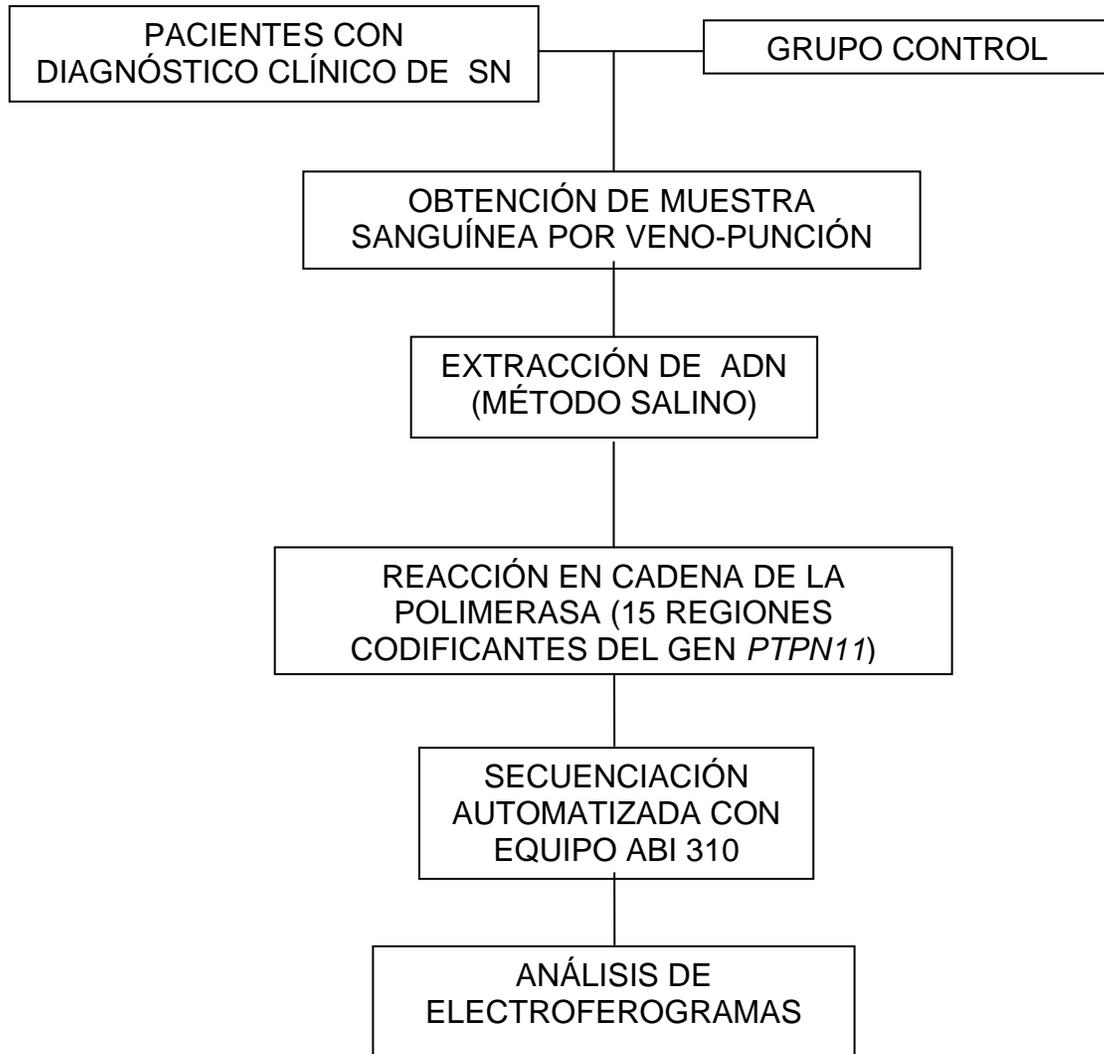
VARIABLE INDEPENDIENTE

Analizar el orden de la secuencia de bases del ADN en 15 regiones codificantes del gen *PTPN11*.

VARIABLE DEPENDIENTE

Mutación encontrada en el gen *PTPN11* en una muestra de pacientes mexicanos con SN.

4.2 DIAGRAMA DE FLUJO



V. MÉTODOS

1. Diagnóstico clínico del SN en los individuos afectados.

En este estudio participaron 6 familias no relacionadas que son pacientes de la Unidad de Cardiología y Servicio de Genética del Hospital General de México. SS, que presentaron manifestaciones clínicas típicas del SN.

El diagnóstico clínico del SN se realizó mediante el estudio de las características fenotípicas de los pacientes tal y como se menciona en la cédula de recolección de datos.

Los afectados por el síndrome, sus padres y abuelos que se analizaron en este estudio, fueron nacidos en México.

Como grupo control se estudiaron 50 personas sanas, que no presentaron historia de cardiopatía, estenosis pulmonar, retraso mental, ni facies típica de los pacientes afectados con SN.

Una vez captado un posible sujeto de estudio se le informó los objetivos del protocolo y después de firmar una carta de consentimiento (anexo 1), se tomó una muestra sanguínea de 5 ml.

2. Método de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de sangre periférica. Anexo 2

A partir de 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA se llevó a cabo la extracción de ADN, que consiste en 3 pasos básicos: lisis celular, eliminación de proteínas y precipitación del ADN. Se almaceno a -20°C para su posterior análisis.

3. Análisis espectrofotométrico del ADN genómico. Anexo 3

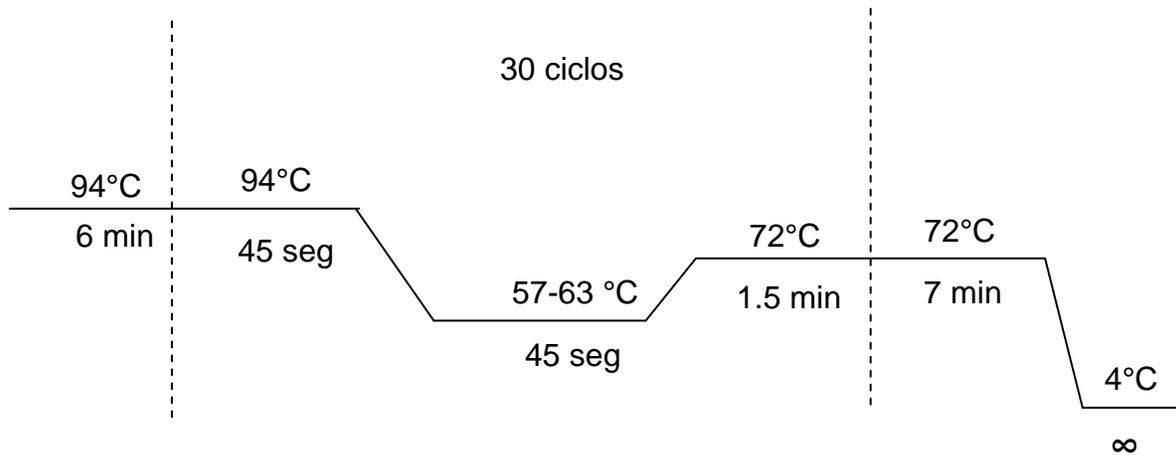
Con este análisis se mide la concentración y el factor de pureza del ADN.

4. Electroforesis horizontal en gel de agarosa. Anexo 4

En este análisis se identifica la presencia, integridad y tamaño del segmento de ADN.

5. Amplificación de regiones del gen *PTPN11* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Anexo 5

La PCR permite amplificar un segmento delimitado por un par de oligonucleótidos los cuales son altamente específicos de la región a ser analizada. Esta reacción se lleva a cabo a determinadas temperaturas y tiempos específicos para estas regiones del gen *PTPN11*, las cuales se describen a continuación:



6. PCR para secuenciación. Anexo 6

En esta amplificación obtendremos cadenas sencillas de ADN las cuales tienen incorporado uno de los cuatro dideoxinucleótidos al final de la cadena, estando esta última base marcada con uno de los 4 diferentes fluorocromos.

7. Purificación del producto de PCR para secuenciación. Anexo 7

Con este procedimiento eliminamos el exceso de dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos que se adicionan en la PCR para secuenciación.

8. Secuenciación automatizada. Anexo 8

Nos permite conocer el orden de la secuencia de bases del ADN que conforma el fragmento amplificado marcado con fluorocromos.

9. Obtención de electroferograma.

En este resultado impreso analizamos detalladamente el orden de la secuencia de ADN comparando este electroferograma con el orden de la secuencia reportada del Genoma Humano ⁽³⁰⁾.

Identificando en 15 exones la presencia de cambio en el orden de la secuencia de estas regiones codificantes. En donde implique un cambio de codón y ésta a su vez pueda originar algún cambio de aminoácido (anexo 9 y 10).

En las Tablas 5-7 se describen listado de reactivos grado biología molecular, equipos y secuencia de oligonucleótidos que fueron utilizados en este estudio.

CÉDULA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

SERVICIO DE GENÉTICA

Fecha: _____

Nombre:

No. Expediente:

Edad:

Sexo:

Antecedentes gineco-obstétricos:

Menarca

Ritmo

Pubarca

Telarca

Gesta:

Para:

Cesáreas:

Abortos

FUM

FUP

Método de plan familiar:

Antecedentes perinatales

G:

P:

C:

A:

Duración del embarazo:

Ingesta de medicamentos:

Exposición a radiación:

Exposición a teratógenos:

USG:

Enf. Durante la gestación:

Amenaza de aborto:

Peso al inicio del embarazo:

Peso al final del embarazo:

Movimientos fetales:

Atención del parto:

Complicaciones:

Placenta

L. amniótico

Cordón

Lloró:

Respiró:

Producto:

Peso

Talla:

P.C:

P.T:

P.A:

Cianosis:

Convulsiones:

Ictericia:

Internamiento:

Clínica SN

CARACTERÍSTICAS	SI	NO
Facies triangular		
Frente prominente		
Hipertelorismo		
Pliegue epicántico		
Ptosis palpebral		
Linfedema		
Pabellones auriculares de implantación baja y/o malformados.		

Continuación de la clínica SN

CARACTERÍSTICAS	SI	NO
Mala oclusión dental		
Micrognatia		
Cuello corto		
Pterigium colli		
Baja implantación de la línea del pelo.		
<i>Pectus excavatum o carinatum</i>		
Columna vertebral con xifosis o escoliosis		
Piel con nevos		
Estenosis Pulmonar congénita		
Defectos septales		
Lesión valvular		
Fatiga		
Estenosis displásica		
Cardiopatía		
Cardiomiopatía hipertrófica (HCM)		
Cúbito valgo		
Criptorquidia (Especificar uni o bilateral)		
Retaso mental		
Pubertad retrasada		
Retraso esquelético		
Alteraciones hematológicas		

Observaciones:

SERVICIO DE GENÉTICA

ÁRBOL GENEALÓGICO.

Fecha: _____

Nombre:

No. Expediente:

Consanguinidad:

Cariotipo:

Observaciones:

Endogamia:

NOMBRE Y FIRMA DEL MÉDICO

VI. RESULTADOS

En las figuras 4, 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos en el análisis molecular mediante secuenciación automatizada del gen *PTPN11* en 6 familias no relacionadas con diagnóstico clínico de SN (4 casos esporádicos y 2 casos familiares) y 50 personas sanas como grupo control.

Se amplificaron 15 regiones codificantes que constituyen el gen *PTPN11* siendo realizadas mediante PCR para su posterior análisis mediante secuenciación automatizada.

En el caso familiar B (II-3 y III-1), se identificó una mutación de sentido equivocado localizada en el nucleótido 236 (exón 3) lo que condicionó el cambio de adenina (A) por guanina (G). Esta mutación se encontró en el codón 79 y resultó en la sustitución del aminoácido glicina (Gln) por arginina (Arg) (Q79R). La paciente II-3 presentaba un embarazo de 24 semanas de gestación, por lo que se le indicó la realización de un ultrasonido en el cual se observaron algunas características clínicas del SN. Esta paciente II-3 llegó a término de su embarazo, siendo un producto de sexo masculino (III-1), al cual también se identificó la mutación Q79R.

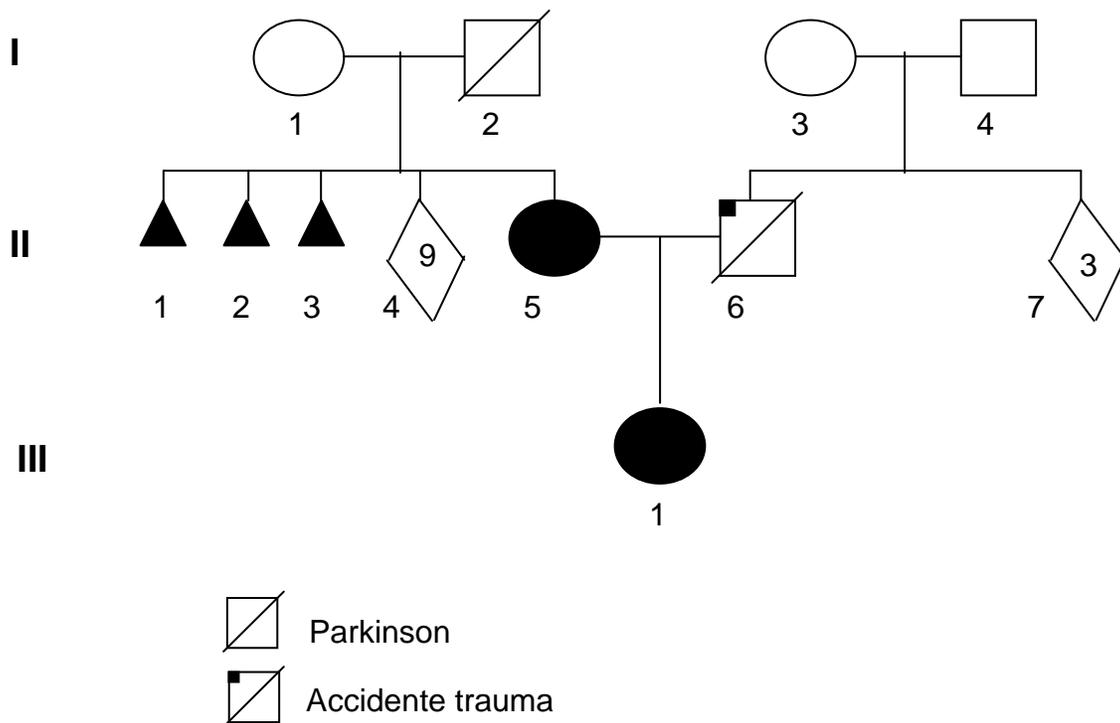
En 4 casos esporádicos, 1 caso familiar y el grupo control presentaron electroferogramas correspondientes a la secuencia normal según lo reportado en la base de datos del Genoma Humano.

A continuación se muestran las características genealógicas y clínicas de los pacientes estudiados.

CASO FAMILIAR A:

Paciente femenino (II-5) de 57 años de edad, que presenta hipertelorismo, fisuras palpebrales oblicuas descendentes, puente nasal deprimido, talla de 1.32 m, 45 kg de peso y cardiomiopatía. Menopausia a los 53 años. Cariotipo normal (técnica de bandas G).

Paciente femenino (III-1) de 33 años de edad, que presenta hipertelorismo, fisuras palpebrales oblicuas descendentes, puente nasal deprimido, 1.29 m de estatura, 40 kg de peso y problemas de fatiga. Producto prematuro. Menarca a los 14 años, 3 días de sangrado con 28 días regulares. Cariotipo normal.

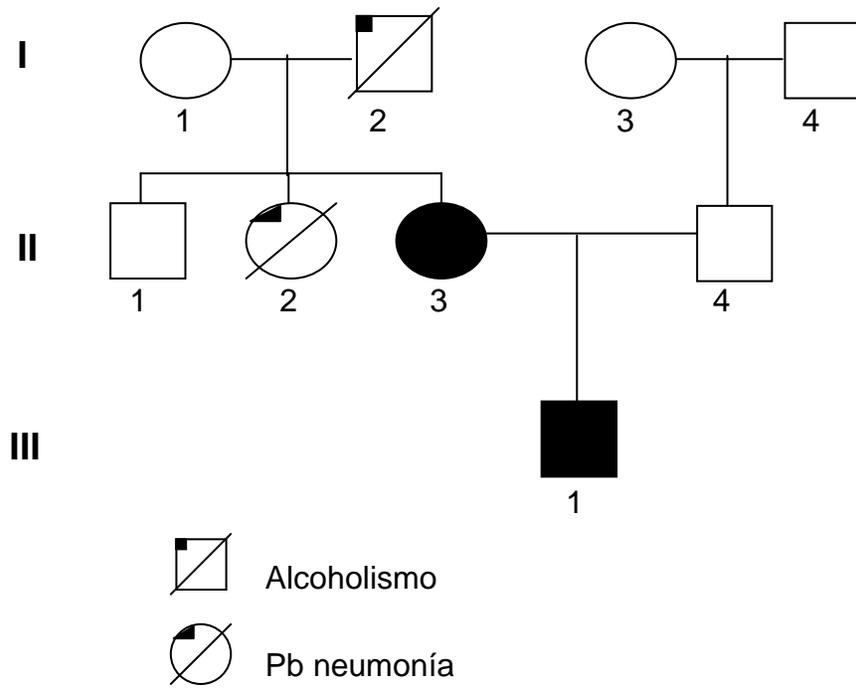


CASO FAMILIAR B:

Paciente femenina (II-3) de 38 años, estatura de 1.41 m, peso de 64 kg, hipertelorismo, puente nasal ancho, fisuras palpebrales oblicuas descendentes, boca en forma de pescado, paladar alto, cuello corto, cubitus valgus, retardo en el desarrollo sexual, múltiples nevos, piel seca, estenosis valvular y cariotipo normal . En el momento del examen clínico presentaba un embarazo de 24 semanas de gestación con aparente desarrollo normal. El ultrasonido mostraba polihidramnios, braquicefalia, prominencia frontal, hipertelorismo, proptosis ocular, puente nasal deprimido, boca en forma de pescado, cuello corto, edema e incremento de fluido nuchal.

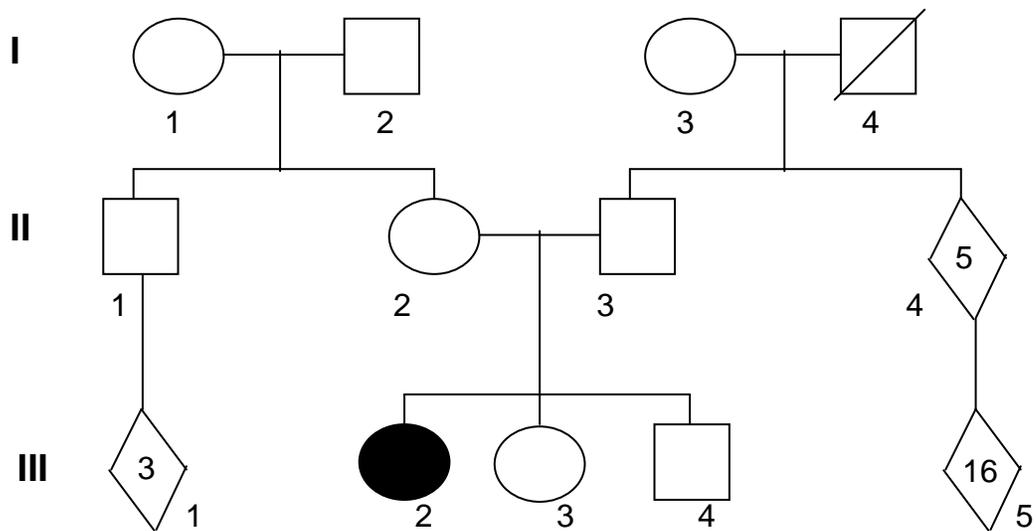
Paciente masculino (III-1) de un mes de nacido. Paciente de término con peso de 2,100g, 48 cm de altura, características faciales de SN como refiere en el USG, también presentó fisuras palpebrales oblicuas descendentes, piel redundante nuchal, tórax ancho y criptorquidia bilateral. Sufrió sepsis neonatal. No hay datos aparentes de defectos cardiacos congénitos.

CASO FAMILIAR B:



CASO ESPORÁDICO C:

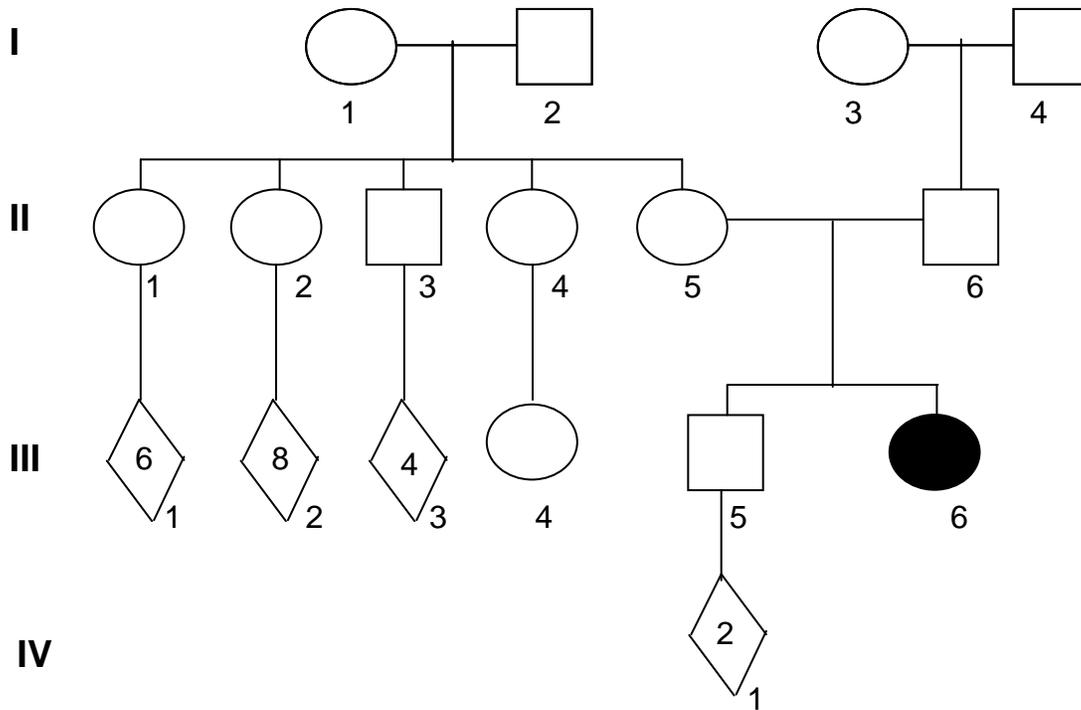
Paciente femenino (III-2) de 15 años de edad, 1.24m de estatura, asimetría facial, hipertelorismo, fisuras palpebrales oblicuas descendentes, cuello corto, puente nasal deprimido, implantación baja del cabello, deformidad en el tórax, retraso mental. Cariotipo normal.



 Neumonía

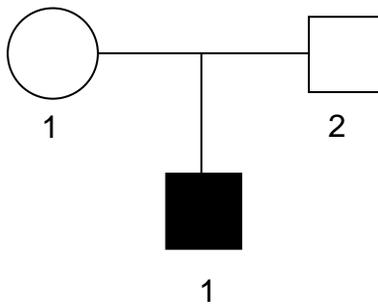
CASO ESPORÁDICO D:

Paciente femenino (III-6) de 29 años de edad, altura de 1.35 m, peso de 48 kg, hipertelorismo, asimetría facial, cuello corto, cubitus valgus. Cariotipo normal



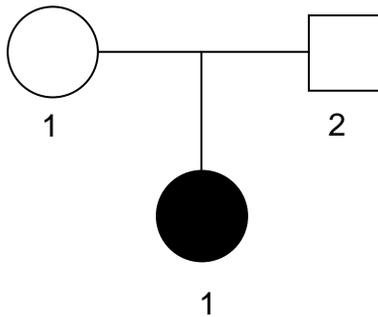
CASO ESPORÁDICO E:

Paciente masculino de 11 años de edad, estatura de 1.20 m, peso de 34 kg, hipertelorismo, puente nasal deprimido, asimetría facial, retraso mental. Cariotipo normal.



CASO ESPORÁDICO F:

Paciente femenino de 32 años de edad, estatura de 1.35 m, peso de 48 kg, fisuras palpebrales oblicuas, cuello corto, anomalías cardiacas, filtrum amplio y largo, paladar alto. Cariotipo normal.



ELECTROFORESIS

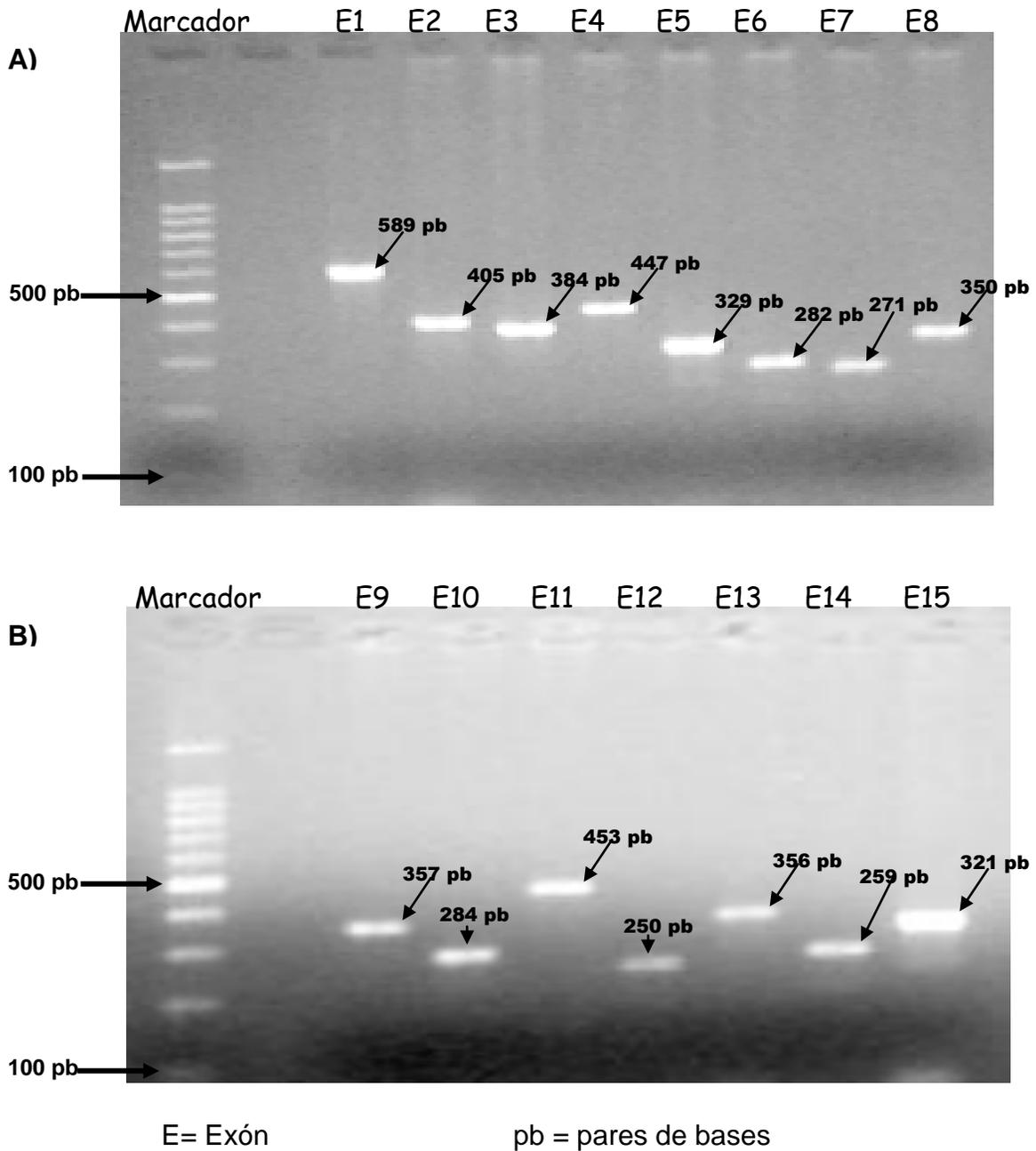


Figura 4. Gel de agarosa al 1.5%. A) Se muestran los productos de amplificación de los exones 1 a 8 del gen *PTPN11*, B) Se observan las amplificaciones correspondientes de los exones 9 a 15 del gen *PTPN11*. Las flechas señalan el tamaño molecular en pb de los segmentos analizados (Tartalia M y cols. 2001), teniendo como referencia el marcador comercial de 100 pb.

PACIENTES II-3 Y III-1 DEL CASO FAMILIAR B.

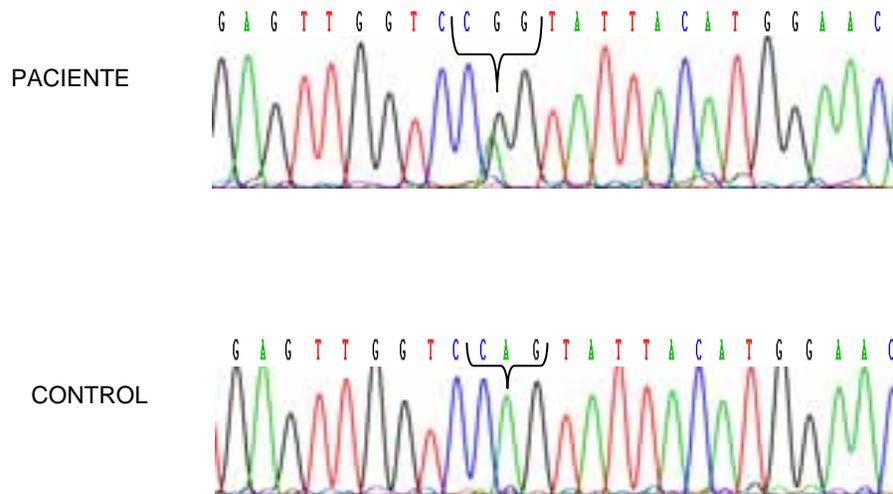


Figura 5. Electroferograma de una secuencia parcial del gen *PTPN11* del caso familiar B en donde se muestra el cambio de A por G en el exón 3 nucleótido 236. Dicho cambio resulta en la substitución del aminoácido Gln por Arg en el codón 79 (Q79R).



Figura 6. Ultrasonido del paciente III-1 del caso familiar B de 24 semanas de gestación en el cual se muestra polihidramnios, braquifalia, prominencia frontal, hipertelorismo, proptosis ocular, puente nasal deprimido, boca en forma de pescado, cuello corto, edema e incremento de fluido nuchal.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se realizó el análisis molecular del gen *PTPN11* mediante secuenciación para identificar mutaciones en las regiones codificantes, tanto en casos esporádicos como familiares. Los pacientes analizados fueron 2 casos familiares y 4 casos esporádicos. Los datos clínicos en general fueron los establecidos para SN: estatura corta, asimetría facial, hipertelorismo, fisuras palpebrales oblicuas descendentes, puente nasal deprimido, implantación baja de cabello, filtrum amplio y largo, cuello corto, paladar alto, deformidad del tórax, anomalías cardíacas, retraso mental, *cubitus valgo* y múltiples nevos. Todos los casos tuvieron un cariotipo correspondiente a su sexo sin alteraciones numéricas ni estructurales (técnica de bandas G).

Al realizar el análisis molecular en los 4 casos esporádicos no se identificó cambio en la secuencia del ADN del gen *PTPN11*, ya fuera presencia de mutación de sentido equivocado, delección o bien de polimorfismos, por lo que se descartó la afección del gen *PTPN11* como causal en la génesis del SN de estos cuatro pacientes. El hecho de no haber identificado mutación en el gen *PTPN11* enfatiza la heterogeneidad génica presente en el SN, por lo que sería necesario en estudios posteriores el análisis de otros genes implicados en el SN, como es el caso del gen *KRAS* y *SOS1*, que también forman parte de la vía Ras-MAPK. No se descarta tampoco la posible participación del gen *RAF1*, en el cual

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

recientemente se han reportado mutaciones en el SN y que representan 3-17% de los pacientes con este síndrome⁽¹³⁾.

Con respecto al análisis molecular en los dos casos familiares sólo el caso B presentó mutación de sentido equivocado (Pacientes II-3 Y III-1), una mutación previamente reportada y que se ha confirmado que produce SN.

El SN se presenta con patrón de herencia autosómica dominante con predominancia de transmisión materna. Las mutaciones de novo en *PTPN11* en casos esporádicos con SN son de origen predominantemente paterno ⁽⁹⁾. Aproximadamente, 50% de los pacientes con SN, familiares y esporádicos, presenta una mutación en el gen *PTPN11*, que generalmente es de sentido equivocado. Las mutaciones asociadas con SN dan como resultado una ganancia de función de la proteína SHP-2. Este tipo de mutación es encontrada en 60% de los casos familiares ^(1, 2, 34).

Al realizar el análisis molecular en el caso B, madre (paciente II-3) e hijo (III-1), se identificó la mutación de sentido equivocado localizada en el exón 3, siendo una transición de la base adenina por guanina que se ubica en la posición 236 originando que el aminoácido Gln79 sea substituido por Arg79 (Q79R). Esta mutación del gen *PTPN11* no fue encontrada en 50 controles. La mutación Q79R fue reportada previamente por Tartaglia y cols. ⁽¹⁾ en 2001, en donde mencionan un caso familiar y uno esporádico con síndrome de Noonan quienes postularon

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

que esta sustitución afecta residuos altamente conservados en el dominio N-SH2. Por otro lado, Sarkozy y cols. ⁽³²⁾ en 2003 describe una mutación de sentido equivocado en el mismo nucleótido 236, que produce el cambio de adenina por citosina originando la sustitución del aminoácido Gln79 por Pro79 (Q79P), esta mutación fue identificada en dos casos esporádicos en donde ambos pacientes presentaron estenosis valvular pulmonar.

Alrededor de 86% de las mutaciones de sentido equivocado se han identificado en los exones 3, 8 ó 13 ^(10, 40). La mayoría de estas mutaciones afectan la interacción entre los dominios N-SH2 Y PTP de SHP-2, esta proteína en su estado conformacional basal genera una proteína inactiva. Así, estas mutaciones alteran estas interacciones produciendo un estado conformacional basal activo sin alterar la capacidad catalítica de SHP-2. Esto es, la actividad PTPasa per se es requerida para la transducción de señales a través de la vía MAPK ⁽¹⁰⁾. La explicación molecular de la unión del dominio N-SH2 y el dominio PTP se mantiene en ausencia de fosfotirosina, inhibiendo la actividad fosfatasa, mientras que la interacción intermolecular de el dominio N-SH2 con fosfotirosina provoca disociación de la unión intramolecular N-SH2/PTP, activando la función fosfatasa. Entonces, al presentarse una mutación de sentido equivocado causa una sustitución de aminoácido alrededor de la interacción N-SH2/PTP, por lo que en ausencia de fosfotirosina se provoca la disociación de esta unión, llevando a una excesiva actividad fosfatasa ⁽⁴³⁾

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La mutación más frecuente en SN es una transición de adenina a guanina en el nucleótido 922. Esta corresponde a 25% de los casos reportados y lleva a una sustitución de Asn308Asp siendo más frecuentemente identificada en los casos familiares (9).

En el caso familiar B analizado en este estudio, la paciente II-3 fue atendida en el servicio de Clínica de Alto Riesgo, referida por gesta a los 38 años de edad y embarazo de alto riesgo, la paciente cursaba un embarazo de 23 semanas de gestación.

En la semana 24 de gestación fue atendida en el servicio de Genética en donde se le indicó un USG en el cual se identifica polihidramnios, braquicefalia, prominencia frontal, hipertelorismo, ptosis palpebral, puente nasal deprimido, boca en forma de pescado, cuello corto, edema e incremento de la translucencia nual. Se indicó la realización de estudio molecular del gen *PTPN11* en células que se obtendrían por amniocentesis. Sin embargo, la paciente no estuvo de acuerdo. Ella refirió que deseaba continuar con su embarazo. El paciente al nacimiento presentó pterigium colli, implantación baja del pelo, criptorquidia e hipotonía. El estudio cardiológico no reportó alteración alguna. Su cariotipo fue 46,XY sin alteraciones numéricas o estructurales. Como ya se mencionó anteriormente la mutación (Q79R) ya había sido reportada previamente en pacientes con cuadros clínicos similares.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los pacientes portadores de la mutación en el gen *PTPN11* muestran una alta incidencia de estenosis pulmonar y baja incidencia de cardiomiopatía obstructiva hipertrófica a diferencia de los pacientes con SN que no presentan mutación en el gen (2, 34). En el presente estudio la paciente II-3 del caso familiar B presentó una estenosis valvular la cual fue detectada hasta los 6 años de edad.

Por otra parte, la mayoría de los individuos con SN presentan un patrón normal de adaptación en la sociedad, exceptuando en los casos en que se observa retraso mental, ya que ellos requieren de terapia de estimulación temprana. Es importante mencionar que el paciente debe estar bajo supervisión constante de distintos especialistas como genetistas clínicos, cardiólogos, cirujanos, anestesistas, ginecólogos, pediatras y dermatólogos.

En este estudio se identificó mutación en un solo caso familiar de 2 analizados, mientras que en los 4 casos esporádicos no se localizó ninguna mutación. En este análisis molecular del gen *PTPN11* en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de SN donde no se describió mutación es necesario identificar la participación de otros genes que causan SN.

Cabe mencionar que también se han reportado duplicaciones de la región 12q24 asociadas al SN por lo que es necesario incluir el análisis citogenético en estos pacientes.

El diagnóstico de SN se realiza clínicamente, aunque esto puede ser muy difícil debido a que presentan una gran variabilidad en la expresión fenotípica. Esto hace que para el estudio genético del SN se requiera un análisis molecular para llegar a

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

un diagnóstico preciso y así el paciente reciba un asesoramiento genético adecuado.

VIII. CONCLUSIONES

Al detectar la mutación de sentido equivocado Q79R del gen *PTPN11* en un caso familiar se determina que es causal del SN, una enfermedad genéticamente heterogénea. El diagnóstico prenatal fue posible a través de un ultrasonido de 24 semanas de gestación y el cual fue confirmado posteriormente al nacimiento. El monitoreo mediante ultrasonido durante el embarazo debe ser sugerido en este caso familiar.

Al no identificar mutación en el gen *PTPN11* en los 4 casos esporádicos y un caso familiar no debe excluirse el diagnóstico de SN ya que existen otros genes que causan SN como son *KRAS*, *SOS1* y *RAF*.

Es necesario complementar el estudio molecular para identificar más genes candidatos para SN, así como para identificar duplicaciones que implican la región 12q24 como recientemente se ha reportado.

IX. REFERENCIAS

1. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001;29 (4):465-468.
2. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2002;70 (6):1555-1563.
3. Tartaglia M, Cordeddu V, Chang H, Shaw A, Kalidas K, Crosby A, et al. Paternal germline origin and sex-ratio distortion in transmission of PTPN11 mutations in Noonan síndrome. *Am J Hum Genet* 2004; 75 (3):492-497.
4. Limal JM, Parfai B, Cabrol S, Bonnet D, Leheup B, Lyonnet S et al. Noonan syndrome : Relationships between genotype, growth and growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91 (1):300-306.
5. Jongmans M, Otten B, Noordam K, van der Burgt I. Geneticas and variation in phenotype in Noonan syndrome. *Adv Dysmorphology* 2004;62 (3):56-59.
6. Tartaglia M, Martinelli S, Cazzaniga G, Cordeddu V, Lavarone I, Spinelli M, et al. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood* 2004;104 (2):307-313.
7. Larsen RP, Kronenberg HM, Melmed S, Polonosky KS. *Tratado de Endocrinología*. ELSEVIER. Barcelona, España. 2004
8. Guízar Vázquez JJ, Zafra de la Rosa GF. *Atlas diagnóstico de síndromes genéticos*. Manual Moderno. México, D.F. 1999.
9. Van der Burget I, Rewiew Noonan syndrome. *Orph J Rare Diseases* 2007; 2:4.

REFERENCIAS

10. Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:45-68.
11. Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillessen-Kaesbach G, et al. Spectrum of mutations in PTN11 and genotype.phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* 2002;11:201-206.
12. Neels BG, Gu H, Pao L. The “Shp” ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 2003;28 (6):284-293.
13. Shchelochkov OA, Patel A, Weissenberg GM, Chinault AC, Wisniewska J, Fernandes PH, et al. Duplication of chromosome band 12q24.11q24.23 results in apparent Noonan syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2008;146A (8):1042-1048.
14. Dixon JW, Costa T, Teshima JE. Mosaicism for duplication 12q(12q13→q24.2) in a dysmorphic male infant. *J Med Genet* 1993;30 (1):70-72.
15. Harrod MJ, Byrne JB, Dev VG, Francke U. Duplication 12q mosaicism in two unrelated patient with a similar syndrome. *Am J Med Genet* 1980; 7(2):123-129.
16. Tang TL, Freeman RM Jr, O'Reilly AM, Neel BG, Sokol SY. The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early *Xenopus* development. *Cell* 1995; 80 (3):473-483.
17. Saxton TM, Henkemeyer M, Gasca S, Shen R, Rossi DJ, Shalaby F, Feng GS, Pawson T. *EMBO J* 1997; 16 (9):2352-2364.
18. Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 1998; 92 (4): 441-50.
19. Qu CK, Yu WM, Azzarelli B, Feng GS. Genetic evidence that shp-2 tyrosine phosphatase is a signal enhancer of the epidermal growth factor receptor in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96 (15):8528-8533.

REFERENCIAS

20. Chen B, Bronson RT, Klamann LD, Hampton TG, Wang JF, Green PJ, et al. Mice mutants for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet* 2000; 24 (3):296-299.
21. Oishi K, Gaengel K, Krishnamoorthy S, Kamiya K, Kim IK, Ying H, et al. Transgenic Drosophila models of Noonan syndrome causing PTPN11 Gain-of-function mutations. *Hum Mol Genet* 2006;15 (4):543-53.
22. Feng GS. Shp-2 Tyrosine Phosphatase: Signaling One Cell or Many. *Exp Cell Res* 1999;253 (1): 47–54
23. Tiganis T, Bennett AM. Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem J* 2007;402 (1): 1–15
24. Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, et al. Diversity and Functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet* 2006;78 (2):279-290.
25. Krenz M, Gulick J, Osinska HE, Colbert MC, Molkentin JD, Robbins J. Role of ERK1/2 signaling in congenital valve malformations in Noonan syndrome. *PNAS* 2008;105 (48):18930-18935.
26. Pluskey S, Wandless TJ, Walsh CT, Shoelson SE. Potent stimulation of Sh-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J Biol Chem* 1995;270 (7):2897-2900.
27. Keihack H, Davis FS, McGregor M, Cantley LC, Neel BG. Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J Biol Chem* 2005; 280 (35): 30984-93.
28. Edouard T, Montagner A, Dance M, Conte F, Kart A, Parfait B, et al. How do shp2 mutations that oppositely influence its biochemical activity result in syndromes with overlapping symptoms?. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64 (13):1585-1590.

REFERENCIAS

29. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor *Physiol Rev* 1999;79(4):1283-1316
30. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=PTPN11>
31. Lynn BJ. *Genética médica*. 2ª. Harcourt, España. 2000.
32. Sarkozy A, Conti E, Seripa D, Digilio MC, Grifone N, Tandoi C, et al. Correlation between PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Med Genet* 2003;40(9):704-708.
33. Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillissen-Kaesbach G, et al. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2003;11(2):201-206.
34. Zenker M, Buheitel G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W, et al. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr* 2004;144(3):368-374.
35. Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriyama S, et al. Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet* 2005;50(4):192-202.
36. Binder G, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt NE. PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(9):5377-5381.
37. Bertola DR, Pereira AC, Oliveira PS, Kim CA, Krieger JE. Clinical variability in a Noonan syndrome family with a new *PTPN11* gene mutation. *Am J Med Genet* 2004;130A(4):378-38.
38. Maheshwari M, Belmont J, Fernbach S, Ho T, Molinari L, Yakub I, et al. *PTPN11* mutations in Noonan syndrome type I: detection of recurrent mutations in exons 3 and 13. *Hum Mutat* 2002;20(4):298-304.

REFERENCIAS

39. Kratz CP, Niemeyer CM, Castlebery RP, Cetin M, Bergsträsser E, Emanuel PD, et al. The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/mieloproliferative disease. *Blood* 2005;106(6):2183-2185.
40. Bertola DR, Pereira AC, Albano LMJ, de Oliveira PSL, Kim ChA, Krieger JE. PTPN11 gene analysis in 74 Brazilian patients with Noonan síndrome or Noonan-like phenotype. *Genet Test* 2006; 10 (3):186-191.
41. Takahashi K, Kogaki S, Kurotobi S, Nasuno S, Ohta M, Okabe H, et al. A novel mutation in the PTPN11 gene in a patient with Noonan syndrome and rapidly progressive hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Pediatr* 2005;164(8):497-500.
42. Bertola DR, Pereira AC, Passeti F, de Oliveira PS, Messiaen L, Gelb BD, et al. Neurofibromatosis-Noonan syndrome: molecular evidence of the concurrence of both disorders in a patient. *Am J Med Genet A* 2005;136(3):242-245.
43. Yoshida R, Hasegawa T, Hasejawa Y, Nagai T, Kinoshita E, Yoko T, et al. Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11 mutation analysis and clinical assessment in 45 patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3359-3364.
44. Lee WH, Raas-Rotschild A, Miteva MA, Bolasco G, Rein A, Gillis D, Vidaud D, Vidaud M, Villoutreix BO, Parfait B. Noonan syndrome type I with PTPN11 3 bp deletion: structure-function implications. *Proteins* 2005;58(1):7-13.
45. Padidela R, Camacho-Hübner C, Attie KM, Savage MO. Abnormal growth in Noonan syndrome: genetics and endocrine features and optimal treatment. *Horm Res* 2008;70(3):129-136.
46. Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimen a without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985;31:164-165.

X. ANEXOS

ANEXO 1.

CARTA DE CONSENTIMIENTO (PACIENTE)

México, D.F. a de de 200 .

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento para participar en el estudio "Análisis molecular del gen *PTPN11* en pacientes mexicanos con síndrome de Noonan ", a cargo del Dr. Sergio A. Cuevas Covarrubias, que se realiza en el Hospital General de México, lo cual he aceptado en forma libre y voluntaria.

Previamente, se me ha explicado en forma satisfactoria que la finalidad es saber si existe mutación en el gen *PTPN11*. Para tal efecto, es necesaria la toma de una muestra de sangre de 5 ml por medio de punción venosa. Entiendo que de ésta investigación se derivará como beneficio el mejor conocimiento de la enfermedad.

Asimismo, se me ha explicado que me es posible solicitar información adicional acerca de mi participación, y que estoy en libertad de negarme a participar en el presente estudio, en tal caso la atención que recibo en esta Institución no se verá afectada. Puedo, si así lo deseo, obtener una copia de esta carta.

Nombre

Firma

Testigo I
Nombre y Firma

Testigo II
Nombre y Firma

CARTA DE CONSENTIMIENTO (CONTROLES)

México, D.F. a _____ de _____ de
200 .

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento para participar en el estudio " Análisis molecular del gen *PTPN11* en pacientes mexicanos con síndrome de Noonan ", a cargo del Dr. Sergio A. Cuevas Covarrubias, que se realiza en el Hospital General de México, lo cual he aceptado en forma libre y voluntaria.

Previamente, se me ha explicado en forma satisfactoria que la finalidad es saber si existen mutación en el gen *PTPN11*. Para tal efecto, es necesaria la toma de una muestra de sangre de 5 ml por medio de punción venosa.

Comprendo que mi participación será para formar parte del grupo de pacientes que no cursan con síndrome de Noonan, pero que de esta investigación se derivará como beneficio el mejor conocimiento de esta enfermedad.

Asimismo, se me ha explicado que me es posible solicitar información adicional acerca de mi participación, y que estoy en libertad de negarme a participar en el presente estudio, en tal caso la atención que recibo en ésta Institución no se verá afectada. Puedo, si así lo deseo, obtener una copia de esta carta.

Nombre

Firma

Testigo I

Testigo II

Nombre y Firma

Nombre y Firma

Anexo 2. Método de extracción de ADN a partir de sangre periférica. [Según el método de Buffone y Darlington (1985) ⁽⁴⁶⁾ y modificada por Sergio A. Cuevas Covarrubias]

Se agregaron 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y un mismo volumen de solución TTS (Tris 10 mM a un pH de 7.6, Triton 1% y Sacarosa 300 mM). Se procedió a tapar perfectamente el tubo y se invirtió varias veces. Posteriormente se centrifugo a 3000 rpm por 6 minutos para proceder a decantar con cuidado el sobrenadante. Observando al final del tubo un pequeño botón, al cual se le agregó 1 ml de solución TTS. Se agitó para resuspender el botón y pasarlo a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Nuevamente se agitó hasta homogenizar. Se centrifugó 2 minutos a 12000 rpm. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml de solución TTS, para luego resuspender. Se centrifugó a 12,000 rpm (repetir de dos a tres veces el paso anterior). Al botón limpio (blanco) se procedió a agregar 570 µl de NaCl 5 mM. Posteriormente se agitó 2 minutos y se colocaron 30 µl de SDS (Duodecil Sulfato de Sodio) al 10% y se agitó vigorosamente por 5 minutos. El contenido del tubo mostró consistencia viscosa. En ese mismo tubo se agregaron 200 µl de NaCl saturado. Se agitó 10 minutos y se centrifugo a 11500 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se decanto el sobrenadante a un tubo de 13 x 1000 mm estéril. Se Añadieron 2 ml de etanol absoluto a -20°C para precipitar el ADN. Se tomó el ADN con una varilla de vidrio, y se enjuagó el ADN con etanol al 70%, Se evaporó el etanol en condiciones estériles y posteriormente se resuspendió el ADN en un tubo eppendorf con 350 µl de agua estéril. Se colocó este tubo en baño maría a 60°C durante 2 horas. Posteriormente se guardó el ADN a -20°C.

Anexo 3. Análisis espectrofotométrico del ADN genómico.

El ADN genómico se descongeló y centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C de temperatura. Se realizó una dilución 1:40. Para ello se tomó una alícuota de 10 µl y se colocó en un tubo eppendorf y se le adicionaron 390 µl de agua inyectable estéril, se agitó y centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C de temperatura. Esta muestra se vertió en una cubeta de cuarzo, la que se colocó en el portacelda del espectrofótometro; se realizó la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nanómetros (nm) de longitud de onda. A partir de estos valores se calculó la concentración y el factor de pureza del ADN genómico de la muestra problema, en donde se utilizaron las siguientes formulas:

$$\text{Concentración ADN genómico} = (\text{DO}^{260}) (\text{FD}) (50 \mu\text{g/ml})$$

Donde:

DO^{260} =valor obtenido de la densidad óptica a 260nm

FD= Factor de dilución

50 µg/ml = valor constante para ADN de doble cadena

El factor de pureza de la solución de ADN genómico se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de pureza} = \text{DO}^{260} / \text{DO}^{280}$$

DO^{260} =valor obtenido de la densidad óptica a 260nm

DO^{280} =valor obtenido de la densidad óptica a 280nm

El valor resultante debe estar en el rango de 1.7-2.0, para que el ADN genómico se use en la PCR.

Anexo 4. Electroforesis horizontal en gel de agarosa.

Se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%: En un matraz de 125 ml se disolvieron 0.17 gr de agarosa en 17 ml de TAE 1X. La mezcla se calentó en un horno de microondas durante 30 segundos a baja intensidad. Se retiró el matraz y en el momento que no se observó la emisión de vapores se agregaron 3 µl de bromuro de etidium 5 mg/ml. Se mezcló la solución mediante movimientos giratorios manuales y se trasvasó esta solución a un molde para electroforesis horizontal, que tenía incorporado un peine para la formación de pozos. La mezcla se dejó reposar durante 20 minutos para que solidificara. Se quitó el peine del molde. Este gel se colocó dentro de la cámara de electroforesis y se cubrió con 170 ml de solución de corrimiento TAE 1X.

Sobre un trozo de papel parafilm se mezclaron con una micropipeta 3 µl de colorante de corrida y 5 µl de muestra problema de ADN. Se tomó la muestra con la micropipeta y fue depositada en el pozo del gel. Se colocaron los cables de corriente en la cámara de electroforesis hacia la fuente de poder, alineando los polos negativo a positivo. Posteriormente se le aplicó una corriente eléctrica de 80 Volts durante 50 minutos mediante una fuente de poder. Terminada la electroforesis se retiró el gel y se observó en un transiluminador de luz UV de onda corta y se tomó la fotografía de éste con una cámara digital analizadora de imágenes (Kodak DC120). Ésta fue impresa en papel mate y se observó la presencia de una banda definida que indica que el ADN está integro.

Colorante de corrida: Se disolvieron 250 mg de azul de bromofenol en 100 ml de glicerol al 30%.

Solución de Bromuro de etidium 5 mg/ml: Se tomó 1 ml de una solución de Bromuro de etidium 10 mg/ml y se colocó en un tubo de plástico color ámbar, posteriormente se adicionó 1 ml de agua inyectable estéril, cuidadosamente se procedió a mezclar y se guardó a temperatura ambiente.

Anexo 5. Amplificación de regiones del gen *PTPN11* mediante PCR.

Se realizó la amplificación de 15 pares de oligonucleótidos (ver tabla 7), cada par de oligonucleótidos (F y R) corresponden a un exón del gen PTPN11. Cada tubo con la mezcla de reacción debe contener solo un par de oligonucleótidos.

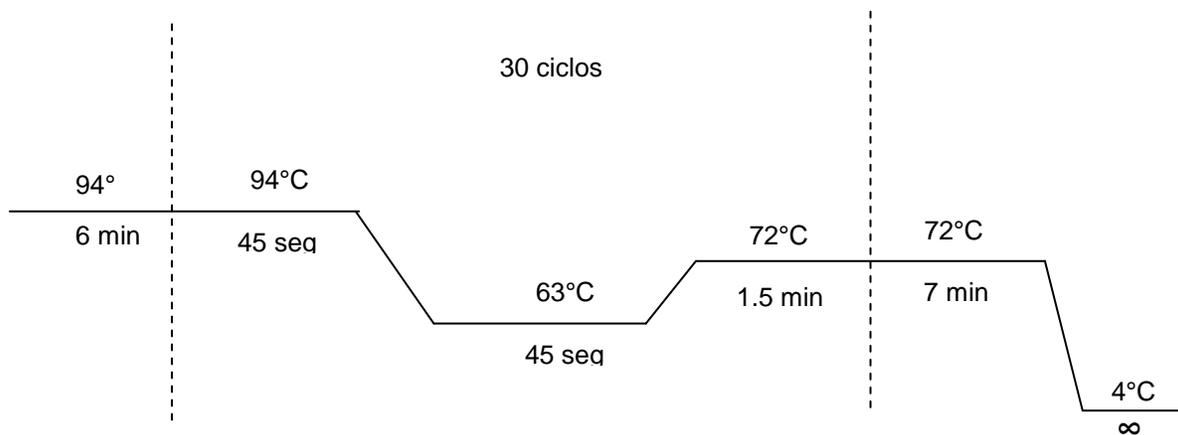
En un tubo de reacción de 0.2 ml se mezclaron los siguientes reactivos:

REACTIVO/EXÓN	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	4	15
Solución amortiguadora 10X	1X	1X	1X
Deoxinucleótidos	200 μ M	200 μ M	200 μ M
*Oligonucleótido F	0.5 μ M	0.5 μ M	0.5 μ M
*Oligonucleótido R	0.5 μ M	0.5 μ M	0.5 μ M
Cloruro de magnesio	1.5 mM	4 mM	2 mM
Enzima Taq polimerasa 5 U/ μ l	2U	2U	2U
ADN genómico	250 ng	250 ng	250 ng
Agua inyectable estéril	c.b.p. 30 μ l	c.b.p. 30 μ l	c.b.p. 30 μ l

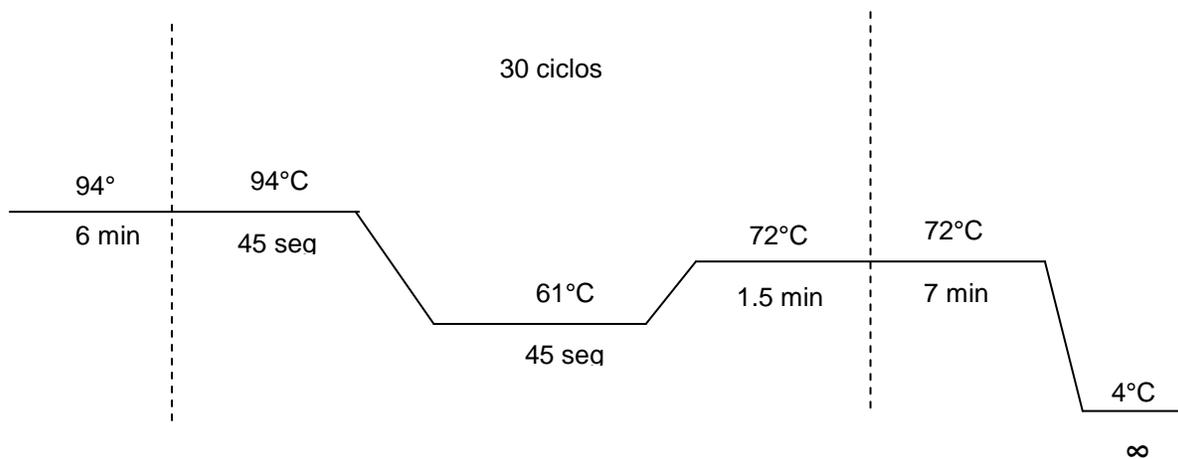
* = Las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron en estas reacciones de PCR y sus productos de amplificación se muestran en la tabla 7.

Estos tubos con la mezcla correspondientes a cada par de oligonucleótidos de los 15 exones a amplificar se colocaron en un termociclador y los programas de amplificación fueron los siguientes:

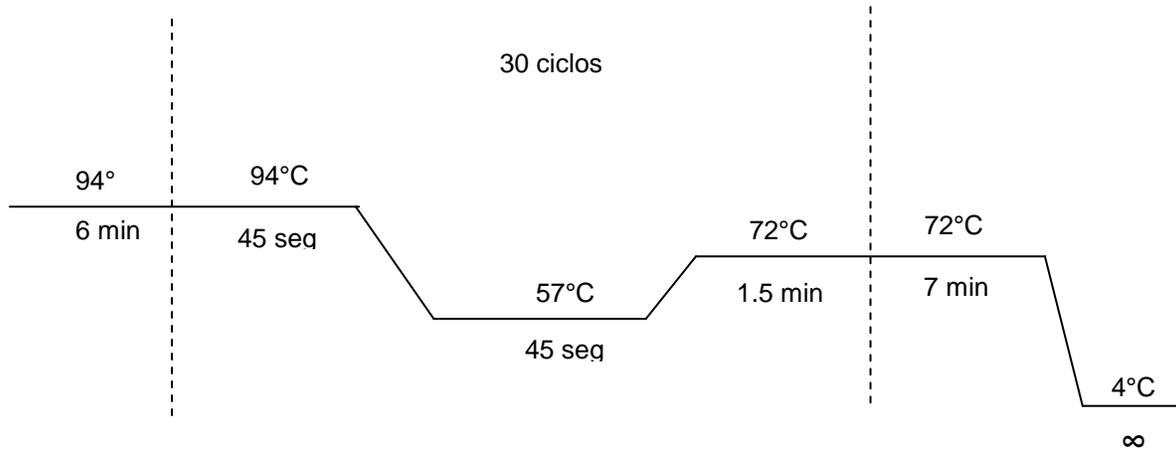
Exón 1:



Exones 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15:



Exones 5, 6, 7, 8, 9:



La temperatura de alineamiento es específica para cada par de oligonucleótidos (F y R). En la tabla 7 se presentan las temperaturas de alineamiento correspondiente a cada par de oligonucleótidos y el tamaño del producto en pb de cada par de oligonucleótidos.

Una alícuota de 5 μ L de templado se sometió a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5%, siguiendo la metodología antes descrita.

Anexo 6. PCR para secuenciación

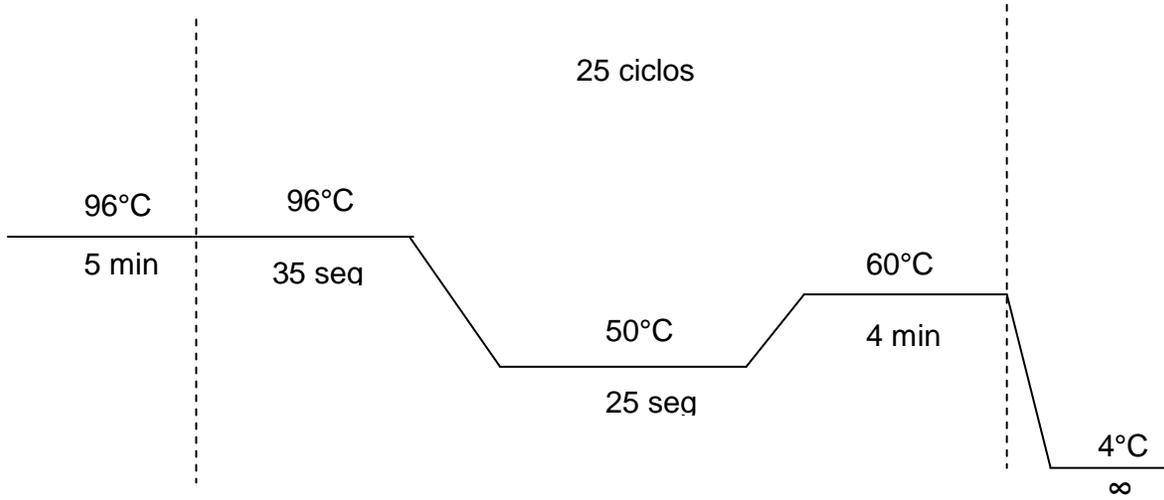
En la PCR para secuenciación se agregó un oligonucleótido (F o R) en el tubo de reacción, correspondiendo éste al templado que se adicionó (Exón 1-15). Por lo tanto, cada tubo de reacción corresponde a un exón para someter a secuenciación.

En un tubo de reacción de 0.2 mL se adicionaron los siguientes reactivos:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
BigDye™ de terminación v3.1	3.5 µl
*Oligonucleótido F o R	0.5 µM
Templado	80-120 ng
Agua estéril inyectable	c.b.p 10 µl

*= Las secuencias de los oligonucleótidos F o R que se utilizaron en estas reacciones de PCR para secuenciación se muestran en la tabla 7.

El tubo con la mezcla se colocó en un termociclador. El programa de amplificación fue el siguiente:



Estos productos de amplificación para secuenciación deben almacenarse a 4°C.

Anexo 7. Purificación del producto de PCR para secuenciación.

Para purificar cada producto que se amplificó para secuenciación, el cual corresponde a una de las 15 regiones del gen *PTPN11*, se utilizó en forma individual una columna de centrifugación centrisep.

A una columna de centrifugación se le adicionaron 800 μ l de agua estéril y se dejó reposar al menos por una hora. En la parte inferior de la columna se colocó la base recolectora de desechos y se centrifugó a 3000 rpm a 22°C de temperatura por 5 minutos. Se sustituyó la base recolectora por un tubo eppendorf de 0.5 ml sin tapa. A la columna de centrifugación se le adicionaron los 10 μ l del producto de PCR para secuenciación que contiene los dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y se centrifugó a 3000 rpm a 22°C de temperatura por 3.5 minutos. El filtrado que se obtuvo en el tubo eppendorf, se colocó dentro de un concentrador de ADN a 30°C de temperatura, durante 20 minutos. Una vez que se obtuvo una pastilla seca fueron agregados 13 μ L de formamida acuosa 1:10.

Los tubos se colocaron en la gradilla de muestras del secuenciador (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer).

Anexo 8. Secuenciación automatizada.

La secuenciación automatizada detectó fluorescencia de cuatro diferentes colores que fueron usados para identificar los dideoxinucleótidos. Cada color emite luz a diferentes longitudes de onda cuando son excitados por un láser ion argón, cuando estas bases pasan por inyección capilar en el secuenciador automatizado.

ANEXO

Anexo 9. El código genético. El tercer nucleótido de cada codón (en negrillas) es menos específico que los dos primeros. Los codones se leen en dirección 5'-3'. Los tres codones de terminación (finales) UUA, UAG y UGA. El codón de inicio es AUG.

	U	C	A	G
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys
	UUA Leu	UCA Ser	UAA End	UGA End
	UUG Leu	UGC Ser	UAG End	UGG Trp
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

Anexo 10. Símbolos de los aminoácidos

Aminoácido	Símbolos de 3 letras	Símbolos de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

XI. TABLAS (5-7)

Tabla 5. Listado de reactivos grado biología molecular que fueron utilizados en este estudio

REACTIVO	MARCA	CATÁLOGO
Sacarosa	Sigma	S0389.
Triton X-100	Sigma	T8787.
Cloruro de sodio	Sigma.	S3014.
Formamida desionizada	Sigma	F9037
Amortiguador Tris-acetato-EDTA 10X (TAE 10X)	Sigma	T-9650
Azul de bromofenol	Sigma	B5525.
Tris (10 mM, Tris-acetato 400 mM a pH 8.3)	Invitrogen	15504-20.
Duodecil sulfato de sodio al 10%	Invitrogen	15553-027.
Oligonucleótidos desalados y desprotegidos de 50 nm	Invitrogen	oligo50nm
Low DNA mass ladder	Invitrogen	10068-013
Bromuro de etidium 10 mg/ml	Invitrogen	15585-011.
Glicerol ultrapuro	Invitrogen	15514-011.
Deoxinucleótidos 100 mM	Roche	1 969 064.
Taq polimerasa, almacenada en amortiguador B (5 U/μl)	Promega	M166B

Tabla 5. (continuación)

REACTIVO	MARCA	CATÁLOGO
Marcador DNA XIV para tamaño de fragmento de 100 pares de bases	Roche	1 721 933.
Polímero POP-6	Applied Biosystems (AB).	402837.
Buffer 10X con EDTA	AB	402834
Kit BigDye Terminator v3.1 cycle Sequencing RR-100	AB	4336911
Etanol	MERCK.	1.00983.1000
Agarosa	BIORAD	161-3101

Tabla 6. Equipos utilizados en el presente estudio.

EQUIPO	MARCA	FABRICANTE
Balanza analítica	Chyo JK-180	Chyp Balance Corp, Japan.
Horno de microondas	SHARP	
Fuente de poder	BRL MODEL 500	Life Technology Inc.
Cámara de electroforesis	Horizon 58	Life Technology Inc.
EDAS (Electrophoresis Documentation and Análisis System)	Kodak DC 120	Eastman Kodak Company Scientific Imaging Systems Rochester, NY.
Transiluminador de onda corta	TFX-20M	Life Technology Inc.
Termociclador	Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems
Concentrador de ADN	Centrivap LABCONCO	Labconco Corporation Kansas City.
Secuenciador	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems

Tabla 7. Pares de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para amplificación de secuencias que codifican para PTPN11 y tamaño de los productos de PCR.

Exón	Secuencia de oligonucleótido (5'- 3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño de producto de PCR (pb)
1	F. GCTGACGGGAAGCAGGAAGTGG R. CTGGCACCCGTGGTTCCCTC	63	589
2	F. ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG R. CAGCAAGCTATCCAAGCATGGT	61	405
3	F. CGACGTGGAAGATGAGATCTGA R. CAGTCACAAGCCTTTGGAGTCAG	61	384
4	F. AGGAGAGCTGACTGTATACAGTAG R. CATCTGTAGGTGATAGAGCAAGA	61	447
5	F. CTGCAGTGAACATGAGAGTGCTTG R. GTTGAAGCTGCAATGGGTACATG	57	329
6	F. TGCATTAACACCGTTTTCTGT R. GTCAGTTTCAAGTCTCTCAGGTC	57	282
7	F. GAACATTTCTAGGATGAATTCC R. GGTACAGAGGTGCTAGGAATCA	57	271
8	F. GACATCAGGCAGTGTTACCGTTAC R. CTAAACATGGCCAATCTGACATGTC	57	350
9	F. GTAAGCTTTGCTTTTCACAGTG R. CTAAACATGGCCAATCTGACATGTC	57	357
10	F. GCAAGACTTGAACATTTGTTTGTTGC R. GACCCTGAATTCCTACACACCATC	61	284
11	F. CAAAAGGAGACGAGTTCTGGGAAC R. GCAGTTGCTCTATGCCTCAAACAG	61	453
12	F. GCTCCAAAGAGTAGACATTGTTTC R. GACTGTTTTTCGTGAGCACTTTC	61	250

Tabla 7. (continuación)

Exón	Secuencia de oligonucleótido (5'- 3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño de producto de PCR (pb)
13	F. CAACACTGTAGCCATTGCAACA R. CGTATCCAAGAGGCCTAGCAAG	61	356
14	F. ACCATTGTCCCTCACATGTGC R. CAGTGAAAGGCATGTGCTACAAAC	61	259
15	F.CAGGTCCTAGGCACAGGAACT R.ACATTCCCAAATTGCTTGCCT G	61	321

F = oligonucleótido de inicio, R = oligonucleótido de término, pb = pares de bases.

Tomada de: Tartaglia M y col. 2002 ⁽²⁾