

Desarrollo y validación de una técnica TP-PCR para diagnóstico de Ataxia de Friedreich

Gulino García, Lucía Antonella¹; Cejas, Jimena Beatriz²; Furfuro, Sandra Beatriz²

¹ Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Médicas.

² Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Médicas, Laboratorio de Análisis de ADN.

Correo electrónico de contacto: sfurfuro@gmail.com

Recibido: 14 de agosto de 2026 – Aceptado: 30 de agosto de 2026

Introducción

La Ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria autosómica recesiva, causada en el 95% de los casos, por la expansión anormal del triplete GAA en el intrón 1 del gen FXN (cromosoma 9q21.11). Esta alteración reduce o anula la síntesis de frataxina, proteína mitocondrial clave para la homeostasis del hierro y la energía celular. Los alelos normales tienen entre 5 y 60 repeticiones; los patológicos, entre 66 y 1.700. El 5% restante de casos corresponde a heterocigotos compuestos. El déficit de frataxina provoca acumulación mitocondrial de hierro, estrés oxidativo y muerte celular, afectando a neuronas sensitivas, médula espinal, cerebelo, corazón y páncreas^{1,2}.

El síntoma principal es la ataxia (falta de coordinación en los movimientos) progresiva, caracterizada por inestabilidad y dificultad de la marcha, pérdida de coordinación motora y alteración del equilibrio, caídas frecuentes, torpeza en manos y brazos, dificultad para correr o subir escaleras. También son frecuentes la disartria cerebelar, disfagia, arreflexia, alteraciones sensitivas, debilidad muscular y signos piramidales^{2,3}.

Epidemiológicamente, es la ataxia hereditaria más común, con una prevalencia en caucásicos de

1:20.000–50.000 y una frecuencia de portadores de 1:90. Típicamente debuta entre los 5 y 15 años con ataxia progresiva, disartria, arreflexia y debilidad. Ante el surgimiento de opciones como omaveloxolona, un diagnóstico genético preciso es crucial⁴. De esto surge la posibilidad de implementar la técnica TP-PCR (Triplet-Primed PCR) que permite identificar expansiones de tripletes de gran tamaño con alta sensibilidad mediante electroforesis capilar^{5,6}.

Objetivos

Desarrollo y validación de una técnica molecular TP-PCR para detección de expansión del triplete GAA en el intrón 1 del gen de la frataxina asociado a Ataxia de Friedreich.

Metodología

Se analizaron 20 muestras de ADN de controles normales, 2 pacientes con diagnóstico confirmado de AF y 1 portador de AF. Los participantes firmaron consentimiento informado (aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo) previo a la extracción de sangre.

La extracción de ADN se realizó por salting out a partir de 3 mL de sangre con EDTA. La cuantificación se efectuó con el fluorómetro Quantus (Promega) según el fabricante.

Para la optimización de la reacción, se probaron diluciones de cebadores (relaciones 1:10 a 1:20, y 1:100 para el cebador forward), diluciones de ADN (20 ng/μL a 1 ng/μL), adición de Q-Solution (Qiagen) y comparaciones con el kit Expand Long Range (Roche) y su programa térmico.

La composición final por tubo de reacción es: 5 ul Qiagen Multiplex PCR kit, 2 ul Q-Solution Qiagen, 0,25 ul Primer F TP-PCR (5'-6-FAM_CAAATGGTGAAACCCAGTATCTA-3') 5uM, 0,25 ul Primer mix R 5uM (compuesto por 5 partes de cebador 5GAA (5'-CCCGGCTAACTTTCTTTATT(TTC)₅- 3' con 1 parte de cebador 7GAA (5'-CCCGGCTAACTTTCTTTATT(TTC)₇), 1,5 ul agua estéril y 1 ul de ADN (5 ng/ul). Programa de amplificación: 95°C 15 minutos; (94°C 30 segundos; 59,5°C 30 segundos; 72°C 1 minuto) por 34 ciclos; 72°C 30 minutos. Los productos se inyectaron en el secuenciador automático SeqStudio (ThermoFisher Scientific) preparados con formamida y marcador GeneScan 600LIZ⁷.

Para secuenciar la región GAA, se seleccionaron 2 muestras con patrón homocigota (pico de 92 bp en TP-PCR). Se realizó Long-Range PCR (LR-PCR) con los cebadores LR-PCR F 5'-TTGTGTTGAAGAACTTTGGGATTGG-3' y LR-PCR R 5'-GCTTTCCTAGAGGAGATCTAAGGACC-3'. Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 2%, se purificaron con Illustra ExoProStar y se secuenciaron por método Sanger con el reactivo BigDye 1.1 y el cebador LR-PCR R⁷.

Resultados

La técnica optimizada permitió diferenciar patrones según la longitud del triplete GAA, midiendo el tamaño en pares de bases. En los individuos sanos se observaron picos específicos correspondientes a alelos con número normal de repeticiones, pudiendo evidenciarse un único pico en pacientes homocigotas o dos picos en

pacientes heterocigotas. Por otro lado, en el paciente portador de mutación por expansión en el gen FXN, se identificó, además del pico específico correspondiente al alelo normal, un patrón en escalera característico que constituye un indicador de expansión del número de repeticiones. Finalmente, en los pacientes confirmados con AF, se observó un patrón en escalera, sin evidencia de picos específicos correspondientes a alelos normales (Figura 1).

La secuenciación Sanger confirmó 9 repeticiones GAA en los controles analizados (pico de 92 bp), sirviendo de referencia para extrapolar el tamaño del resto de los alelos (Figura 2).

Se analizaron un total de 23 muestras, de las cuales 11 (47,8%) presentaron un patrón heterocigota y 9 (39,1%) fueron homocigotas. Además, se confirmó el resultado para el paciente portador de la expansión en el gen FXN y para los dos pacientes con diagnóstico confirmado de AF.

En los controles sanos, el número de repeticiones osciló entre 8 y 32, siendo el alelo de 10 repeticiones el más frecuente, seguido por el de 8 repeticiones.

Discusión

El diagnóstico de AF requiere confirmación molecular. Mientras que la PCR estándar falla en amplificar alelos muy grandes y el Southern Blot consume mucho tiempo y ADN, la TP-PCR destaca por su alta sensibilidad y rapidez para detectar expansiones mayores^{5,6,7}. Su principal inconveniente es la dificultad para cuantificar con precisión el número exacto de repeticiones en expansiones masivas, por lo que su combinación con LR-PCR constituye la estrategia complementaria ideal.

La secuenciación Sanger/NGS se reserva para la búsqueda de mutaciones puntuales en pacientes con sospecha clínica pero sin expansión GAA. Así,

la implementación conjunta de TP-PCR y LR-PCR se presenta como una alternativa costo-efectiva, rápida y accesible para el cribado genético y la confirmación diagnóstica en la región.

Conclusiones

Se logró el desarrollo, puesta a punto y validación de la técnica TP-PCR para detectar expansiones del triplete GAA en el gen FXN. La metodología demostró ser rápida, sensible y reproducible para

discriminar entre individuos sanos tanto homocigotas como heterocigotas, portadores y afectados. Para consolidar su uso clínico, se prevé ampliar la cohorte de controles caracterizados por secuenciación.

Esta herramienta optimizará el diagnóstico precoz, la detección de portadores y el asesoramiento genético familiar.

Palabras clave: Ataxia de Friedreich – Frataxina - TP-PCR - Diagnóstico genético.

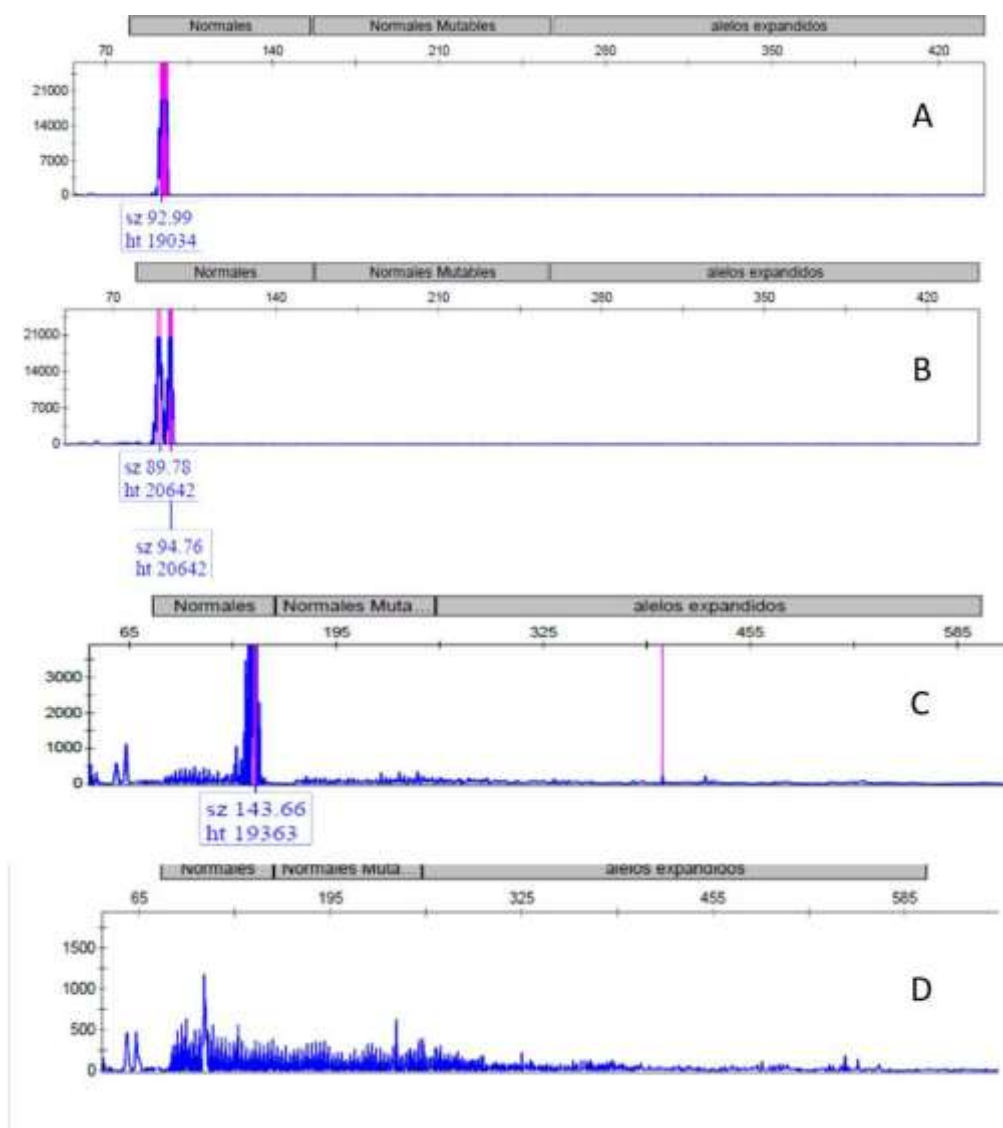


Figura 1. A. Paciente con alelo homocigota normal de 9 repeticiones, B. Paciente con alelos heterocigotas de 8 y 10 repeticiones, C. Paciente portadora de expansión en rango mutado y alelo de 25 repeticiones, D. Paciente con expansión completa en gen FXN.

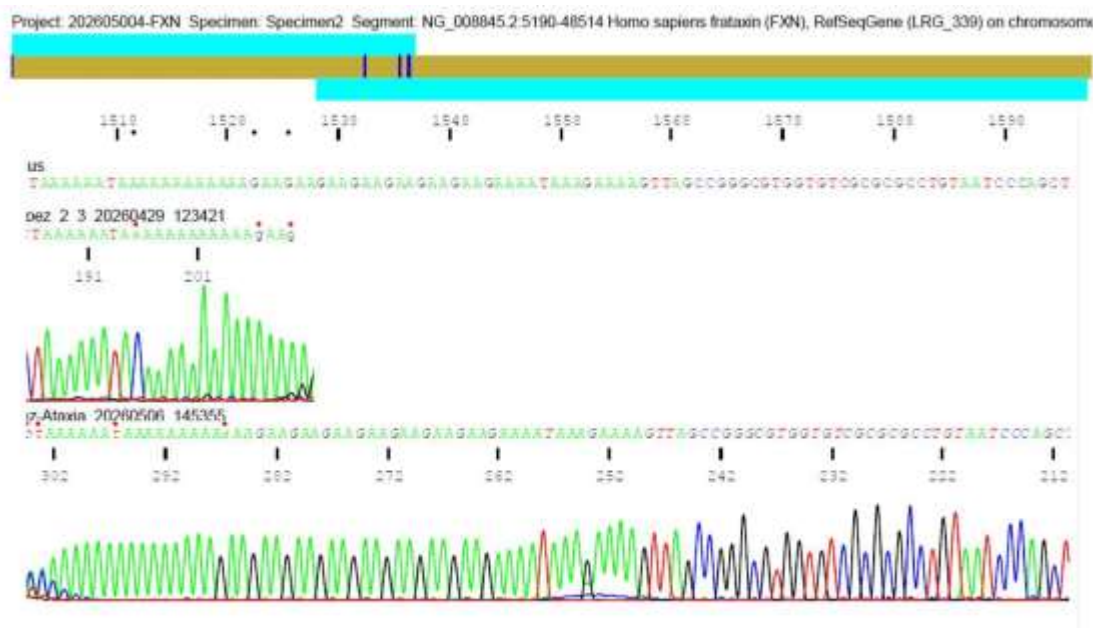


Figura 2. Secuencia de región de repeticiones GAA del gen FXN de una muestra con alelo homocigota de 9 repeticiones.

Referencias bibliográficas

1. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, et al. Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* [Internet]. 1996;271(5254):1423–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.271.5254.1423>
2. Reetz K, Lischewski SA, Dogan I, Didszun C, Pishnamaz M, Konrad K, et al. Friedreich's ataxia-a rare multisystem disease. *Lancet Neurol* [Internet]. 2025;24(7):614–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(25\)00175-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(25)00175-9)
3. Alfaro-Olivera M, Calle-Núñez A, Uribe-León A, Aguirre-Quique W, Sarapura-Castro E, Cornejo-Olivas M. Ataxia de Friedreich, revisión y actualización de la literatura con búsqueda sistemática de casos en Latinoamérica. *Rev Neuropsiquiatr* [Internet]. 2023;86(1):45–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.20453/rnp.v86i1.4466>
4. Gonzalez Moron D, Azcona C, Rodriguez Quiroga S, Vega P, Kauffman MA. Omaveloxolone para la ataxia de Friedreich: un primer paso innovador hacia futuros avances en el tratamiento de esta enfermedad. *Neurol Argent* [Internet]. 2024;16(1):49–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2023.12.00>
5. Ciotti P, Di Maria E, Bellone E, Ajmar F, Mandich P. Triplet repeat primed PCR (TP PCR) in molecular diagnostic testing for Friedreich ataxia. *J Mol Diagn* [Internet]. 2004;6(4):285–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60523-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60523-5)
6. Muthuswamy S, Agarwal S, Dalal A. Diagnosis and Genetic Counseling for Friedreich's Ataxia: A time for consideration of TP-PCR in an Indian Setup. *Hippokratia*. 2013;17(1):38–41.
7. Jama M, Margraf RL, Yu P, Reading NS, Bayrak-Toydemir P. A comprehensive triple-repeat primed PCR and a long-range PCR agarose-based assay for improved genotyping of guanine-adenine-adenine repeats in Friedreich Ataxia. *J Mol Diagn* [Internet]. 2022;24(8):915–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.04.008>