

VOL 82 - N°2  
Mayo - Agosto de 2018  
Ciudad de Bs. As. Argentina  
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa  
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

# Bioquímica y Patología Clínica



**Ronald Ross**

Premio Nobel de Fisiología y Medicina, 1902.



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina.  
Publicación cuatrimestral.



# Bioquímica y Patología Clínica

VOL 82 - N°2  
Mayo - Agosto de 2018  
Ciudad de Bs. As. Argentina  
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa  
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina

## SUMARIO

- Pág. 11 **Desarrollo de un sistema de cuantificación de frataxina humana para el diagnóstico complementario y seguimiento de individuos con Ataxia de Friedreich**  
**Development of a system to quantify human frataxin, for the diagnosis and prognosis of individuals with Friedreich's Ataxia**  
Varela, Carolina; Pikielny, Ralph; Balbi, Noelia; Faraj, Santiago; Santos, Javier; Ferrari, Alejandro
- Pág. 22 **Niveles de vitamina D en una población adulta atendida en un hospital de La Plata**  
**Vitamin D levels in an adult population assisted in a public hospital of La Plata, Argentina**  
Prenner, Paola; Marquez, Paulina; Suescun, María Olga; Melillo, Claudia
- Pág. 30 **Moléculas de adhesión y proteínas oncogénicas de virus de papiloma humano en la progresión de cáncer de cuello uterino**  
**Adhesion molecules and oncogenic proteins of human papiloma virus in the progression of cancer of uterine cervix**  
Guerra, Fernando; Rocher, Adriana; Angeleri, Anabela; Díaz, Lili Beatriz; Mendeluk, Gabriela; Quintana, Silvina; Palaoro, Luis
- Pág. 36 **Marcadores Tumorales Séricos en Carcinoma Hepatocelular**  
**Serum Tumor Markers of Hepatocellular Carcinoma**  
Soria, Analía Graciela
- Pág. 45 **Efecto de la inhalación de las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires: Alteraciones histomorfológicas, metabólicas y bioquímicas a nivel pulmonar y extra pulmonar en ratones jóvenes y adultos mayores**  
**Effect of inhalation of air particles from Buenos Aires City: Histomorphological, metabolic and biochemical alterations in the lung and extra-pulmonary organs of young and adult mice**  
Orona, Nadia Soledad; Astort, Francisco; Ferraro, Sebastián Ariel; Maglione, Guillermo Alberto; Kurtz, Melisa; Agosta, Eduardo Germán; Mandalunis, Patricia Mónica; Morales, Celina; Tasat, Deborah Ruth
- Pág. 59 **Cursos**

# Bioquímica y Patología Clínica

## REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)  
Buenos Aires - Argentina  
Tel/ fax: 4384-7415 / Tel: 4381-2907  
e-mail: info@aba-online.org.ar  
www.aba-online.org.ar  
Registro Nacional de Derechos de Autor N° 034772  
Publicación cuatrimestral

### COMISIÓN DE REVISTA

#### Director:

**Dr. Fernando D. Brites**

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

#### Secretario Científico:

**Dr. Jaime Kovensky**

Hospital Arturo U. Illia, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Carrera de Medicina, Universidad Nacional de la Matanza. Argentina.

#### Comité Editorial:

**Dr. Orlando Gabriel Carballo**

Hospital Carlos G. Durand. Hospital Italiano de Buenos Aires. Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

**Dra. María Laura D'Ámbrosio**

Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Argentina.

**Dra. Isabel Desimone**

Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Universidad Kennedy. Argentina.

**Dra. Cecilia Gasco**

Hospital Carlos G. Durand. Argentina.

**Dr. Julián Verona**

Hospital de Balcarce Dr. Felipe A. Fossati. Argentina.

#### Correctoras:

**Lic. Inés Carozza** (Castellano)

**Lic. María Victoria González Eusevi** (Inglés)

#### Secretarios Administrativos:

**Sr. Gastón Goldberg**

**Sr. Jorge Signorelli**

## ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA - Fundada el 3 de septiembre de 1934

### COMISION DIRECTIVA

Presidente: Dra. Silvia B. González

Vicepresidente: Dra. Patricia Otero

Secretaria: Dra. Viviana Osta

Tesorera: Dra. Isabel Desimone

1º Vocal Titular: Dr. Orlando G. Carballo

2º Vocal Titular: Dr. Alberto Villagra

3º Vocal Titular: Dra. María José Rial

1º Vocal Suplente: Dra. María Rugiero

2º Vocal Suplente: Dr. Eduardo Mormandi

3º Vocal Suplente: Dr. Santiago Fares Taie

### COMISION REVISORA DE CUENTAS

Titular 1º: Dra. Silvia Morilla

Titular 2º: Dra. Estella Meyer

Titular 3º: Dra. Silvia Cajiao

1º Vocal Suplente: Dra. Graciela Astarita

2º Vocal Suplente: Dra. Claudia Ayuso

### COMISIONES INTERNAS

#### PRENSA Y DIFUSIÓN

Presidente: Dra. Laura Colitto

Secretario: Dr. Santiago Fares Taie

Vocales:

Dr. Eduardo Mormandi

#### CERTIFICACION

Presidente: Dr. Alberto Villagra

Secretario: Dra. Viviana Osta

Vocales:

Dra. María José Rial

#### CURSOS

Presidente: Dra. Silvia González

Secretaria: Dra. María Soledad Caldirola

Vocales:

Dra. María de la Paz Domínguez

Dra. Liliana Maggi

Dra. María José Rial

Dra. Alejandra Svartz

Dra. Marysia Szefer

### COMITÉ CIENTÍFICO ASESOR

Dra. Mónica Aixalá

Dr. Gloria Alvarez

Dra. Liliana Arias

Dra. Alicia Blanco

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Silvia González

Dr. Gabriel Migliarino

Dr. Eduardo Mormandi

Dra. Raquel Osatinsky

Dr. Jorge Rey

Dra. María José Rial

Dra. Sandra Rozental

Dra. Gabriela Santizo

Dra. Nora Slobodianik

### PREMIOS Y DISTINCIONES

Dra. Alicia Blanco

Dr. Fernando Brites

Dra. Nilda Fink

Dr. Nestor Litwin

Dra. Raquel Osatinsky

ARTÍCULO ORIGINAL

# Desarrollo de un sistema de cuantificación de frataxina humana para el diagnóstico complementario y seguimiento de individuos con Ataxia de Friedreich

Varela, Carolina<sup>1</sup>; Pikielny, Ralph<sup>2</sup>; Balbi, Noelia<sup>1</sup>; Faraj, Santiago<sup>1</sup>; Santos, Javier<sup>1</sup>; Ferrari, Alejandro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB), Conicet-UBA.

<sup>2</sup>Departamento de Neurología, Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI).

**Contacto:** Dr. Alejandro Ferrari; Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB), Conicet-UBA, Paraguay 2155 6<sup>to</sup> piso, C.A.B.A. [CP 1113]; alejandro.ferrari@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** la Ataxia de Friedreich es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva, caracterizada por la dificultad en el movimiento. La causa es la mutación en el gen que codifica para una proteína mitocondrial denominada frataxina (Fxn), que participa del metabolismo del hierro y el ensamblado de clústeres Fe-S. En todos los pacientes estudiados hasta el momento, hay niveles disminuidos de frataxina, o niveles normales de una proteína no funcional, y se sabe que el tipo de mutación genética condiciona la edad de debut clínico, el avance del cuadro clínico y los niveles de frataxina. Si bien no existe ningún tratamiento definitivo, hay consenso en que la terapéutica futura será la restitución de los valores fisiológicos de Fxn, mediante distintas estrategias moleculares. **Objetivos:** el objetivo de este trabajo fue desarrollar localmente un enzimoimmunoensayo para la cuantificación de Fxn en muestras biológicas, que sea de bajo costo y de relativa sencillez. **Materiales y métodos:** se produjeron la Fxn recombinante y anticuerpos policlonales específicos para dicha proteína, para desarrollar un EIA heterogéneo en fase sólida que permita distinguir individuos con FRDA de individuos sanos, y también de individuos con ataxia no-FRDA, con adecuada sensibilidad y especificidad. **Resultados:** el ensayo permitió distinguir las poblaciones de individuos, estableciéndose como valor de corte 350 fg de Fxn por µg de proteína total. **Conclusiones:** el diseño del ensayo proporciona buena sensibilidad y especificidad (100 % y 95,7 %; respectivamente) y resulta útil para la determinación de Fxn en muestras de sangre.

**Palabras clave:** ELISA, anticuerpos, detección, FRDA, AF.

## Abstract

**Introduction:** Friedreich's Ataxia (FRDA) is a recessive autosomic rare genetic disease, characterized by movement impairment. FRDA is caused by the mutation of the gene that codes for the mitochondrial protein called frataxin (Fxn), which participates in iron metabolism and the assembly of Fe-S clusters. In all FRDA cases studied up to date, individuals have diminished Fxn levels or normal levels but with an impaired Fxn function. In addition, it is well known that the type of mutation determines the age of clinical onset, the progress of the clinical condition and the Fxn levels. Although there is no definitive treatment for individuals with FRDA, there is an international consensus indicating that the main objective should be to restore the physiological values of Fxn, either by promoting mRNA transcription, reducing protein degradation or exogenously administering the protein. **Objectives:** The aim of this work was to develop a low-cost, simple analytical tool based on an enzyme-immunoassay (EIA) for the quantification of Fxn in biological samples. **Materials and methods:** Recombinant Fxn and specific polyclonal antibodies were produced to develop a heterogeneous EIA in solid phase, which allows the distinction of individuals with FRDA from individuals with non-FRDA related ataxias, and individuals without ataxia. **Results:** The assay had adequate sensitivity and specificity. It allowed the distinction of the different populations of individuals under study, establishing a cut-off value of 350 fg of Fxn per µg of total protein. **Conclusions:** The assay design has good sensitivity and specificity (100 % and 95.7 %; respectively) and is useful for Fxn determination in blood samples.

**Key words:** ELISA, antibodies, detection, FRDA, FA.

## Introducción

La Ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva, que presenta un cuadro clínico que se caracteriza por la disartria, la ataxia de miembros superiores e inferiores, la escoliosis, el pie cavo, y las dificultades en la visión, la deglución y los trastornos cardiovasculares [1-3]. La base molecular de la patología consiste en mutaciones en el gen *fxn*, el que codifica para la proteína frataxina (Fxn), que pueden ser de dos clases diferentes: por un lado, en un 95 % de los individuos que padecen FRDA, ambos alelos del gen *fxn* poseen expansiones anómalas de un triplete GAA localizado en el primer intrón, que conduce a menores niveles de ARN mensajero y Fxn madura [13]. En el 5 % restante de los individuos que padecen FRDA, solo uno de los alelos del gen *fxn* posee una expansión del triplete GAA, mientras que el otro posee una de varias mutaciones puntuales posibles, constituyendo lo que se conoce como un individuo heterocigota compuesto. Esas mutaciones son variadas, están distribuidas a lo largo de todo el gen *fxn*, y pueden conducir a un cambio del aminoácido codificado, a un corrimiento del marco de lectura o incluso a la producción de una proteína truncada por la aparición de un codón *stop* prematuro [13-17]. Aunque no es demasiado lo que se sabe, hay un vínculo claro entre el nivel de expresión, la funcionalidad de Fxn y el fenotipo resultante [18-21].

No existe ningún tratamiento definitivo para los pacientes con FRDA, salvo los cuidados paliativos. Independientemente de esta clase de tratamientos, existen ciertos desarrollos en marcha cuya finalidad es restituir los valores fisiológicos de Fxn, enfocados a elevar los niveles de ARN mensajero, o a estabilizar los niveles existentes [22-29]. Adicionalmente, hay quienes sugieren que podría restituirse el fenotipo sano aportando Fxn exógena, como es el caso de la iniciativa descrita por Vyas en 2012 [30].

Aunque la utilidad ha sido descrita antes [31-32], en la actualidad no existe ningún laboratorio en el país que realice la determinación de Fxn en muestras biológicas. Asimismo, los *kits* comerciales para valoración de Fxn –todos ellos de fabricación extranjera– no han sido validados con fines clínicos. En este contexto, resulta fundamental contar con una metodología analítica cuantitativa que permita valorar los niveles de Fxn para su uso en el ámbito clínico. Dicho desarrollo contribuiría al diagnóstico a modo de herramienta complementaria, y también serviría para dar seguimiento tanto a los pacientes que ya reciben alguna clase de tratamiento, como a aquellos que reciban alguno de los tratamientos venideros descriptos más arriba.

En este trabajo se desarrolló localmente un ensayo inmunoenzimático (EIA) de bajo costo y de relativa sencillez para la cuantificación de Fxn en muestras biológicas. Dicha metodología fue luego puesta a prueba con una población de individuos sanos, una población de individuos con FRDA y un grupo de individuos con ataxias no-FRDA.

## Materiales y métodos

### Diseño experimental y población

El diseño del ensayo fue de carácter prospectivo, transversal, observacional, con la finalidad de resolver el problema de la cuantificación de Fxn, en un sentido exploratorio. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por Resolución 1475 (CUDAP: EXP-FYB: 0744012/2012).

A los efectos de conducir las pruebas de validación de la metodología, se conformaron tres cohortes: una de individuos con FRDA, otra de individuos sin ataxia y otra con individuos con ataxia no-FRDA. Las cohortes de individuos con ataxia (tanto FRDA como no-FRDA) se conformaron con pacientes voluntarios de la Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI) y del Hospital de Clínicas José de San Martín, que presentaban sintomatología de ataxia. Para la inclusión en alguno de los dos grupos, se consideró como criterio la existencia de un análisis genético que comprobara o descartara la presencia de FRDA. Los individuos sanos (sin ataxia) fueron reclutados de entre la comunidad, siempre y cuando no tuvieran sintomatología ni antecedentes familiares de ataxia. Todos los individuos fueron debidamente informados de los propósitos del proyecto, de sus alcances y limitaciones, y se les hizo firmar un documento de consentimiento informado. En el caso de ser menores, el consentimiento informado fue firmado por la madre, padre o tutor. Los criterios de exclusión de los voluntarios fueron los mismos que se utilizan habitualmente para la selección de donantes de sangre total y componentes sanguíneos en centros de salud, según el Ministerio de Salud de la República Argentina.

### Producción de Fxn recombinante

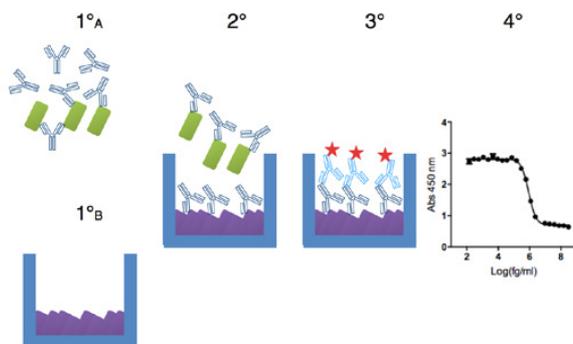
El plásmido conteniendo el gen de la proteína Fxn fue gentilmente cedido por la Dra. Helen Puccio. La expresión de la proteína recombinante fue realizada en *E. coli*, tal como fue descrito antes por este grupo de trabajo [8]. Brevemente, luego de la inducción de la síntesis de la proteína recombinante (rFxn, incluye los residuos 90 a 210 de Fxn), el cultivo de bacterias fue centrifugado a 6.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y el *pellet* fue conservado a -20 °C. Para purificar la proteína, el *pellet* fue resuspendido en *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 7,0, EDTA 1 mM. La lisis celular se logró mediante prensa tipo francesa o sonicación. El lisado obtenido fue centrifugado a 16.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La proteína rFxn fue purificada en dos pasos a partir de la fracción soluble: 1) DEAE pH 7,0 eluyendo con gradiente de NaCl; 2) exclusión molecular en G100. Cada partida de proteína fue sometida a un control de pureza e identidad por SDS-PAGE, exclusión molecular analítica acoplada a dispersión de luz (SEC-MALS-QELS) y HPLC/espectrometría de masa (HPLC/ESI-MS), y un control conformacional por fluorescencia y dicroísmo circular (CD) en el UV cercano y lejano (estructura terciaria y secundaria, respectivamente).

### Producción de anticuerpos anti rFxn

La preparación del suero hiperinmune contra rFxn en conejos de la raza Nueva Zelanda, se realizó empleando rFxn pura de concentración conocida, en presencia de adyuvante (hidróxido de aluminio 4 % p/v, hidróxido de magnesio 4 % p/v, en PBS). El título del antisuero se determinó por la técnica de ELISA, tal como se describe en el párrafo siguiente.

Para producir este suero, los conejos recibieron 6 dosis de 100 µg de proteína rFxn purificada, en adyuvante completo de Freund, a razón de una dosis por semana. Al cabo de ese tiempo se tomó a los animales una muestra de sangre por punción de la arteria auricular. El suero se separó por centrifugación (10 minutos a 3.000 rpm) y fue conservado a -20 °C hasta el momento de su uso. El título de anticuerpos específicos contra el inmunógeno se determinó por ELISA. Brevemente, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp) con 0,5 µg/pocillo de rFxn durante 1 hora a 37 °C, luego se lavó con PBS-Tween 20 0,05 % v/v y finalmente se procedió al bloqueo durante 18 hs (O.N.) a 4 °C con PBS + leche en polvo 3 % p/v. La placa se lavó de igual modo, y los sueros de conejo se incubaron en diluciones seriadas al cuarto, partiendo desde 1/1.600. La presencia de anticuerpos específicos se reveló empleando un anticuerpo conjugado (HRPO) comercial (Bethyl) en dilución 1/5.000, incubado en la placa durante 1 h a 37 °C en un volumen final de 100 µl de diluyente (el mismo que el bloqueante). El revelado colorimétrico se realizó empleando un sustrato cromogénico comercial (TMB, Life Technologies) durante por lo menos 10 minutos, y deteniendo la reacción por agregado de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. La lectura de densidad óptica se realizó en un lector de microplacas (TECAN Instruments) y el análisis de las curvas se realizó utilizando el software Graph Pad Prism 6.0.

**Figura 1.** Esquema del diseño del ELISA de competencia en fase heterogénea.



- ▶ Se observa la secuencia de pasos para la detección de Fxn. Paso 1ºA, preincubación del anticuerpo anti-rFxn con la muestra, o batería seriada de estándares de rFxn de concentración conocida; panel 1ºB, recubrimiento de los pocillos de la microplaca de ELISA con rFxn, y posterior bloqueo de sitios inespecíficos; panel 2º, incubación de la mezcla de anticuerpos y estándares/muestra en los pocillos de la microplaca. Panel 3º, detección de anticuerpos unidos, utilizando un conjugado anti-conejo, marcado con HRP. Panel 4º, aspecto general de las curvas sigmoideas de calibración obtenidas.

### Optimización del EIA

Se optimizó un EIA de competencia en fase heterogénea. Este ensayo consiste en preincubar las muestras o estándares de concentración de Fxn con una dilución conocida de anticuerpo anti-Fxn. La mezcla así obtenida se incubó luego en una microplaca cuyos pocillos han sido recubiertos con Fxn, de modo que los anticuerpos que no han sido bloqueados en la preincubación, quedan pegados a la microplaca. Luego del lavado, los anticuerpos unidos se detectan empleando anticuerpos anti-conejo unidos a peroxidasa (HRPO), y posterior revelado con solución de sustrato cromógeno (TMB), y detenido con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Figura 1). La optimización general del ensayo se realizó en una serie de etapas, que se describen a continuación:

- a) determinar la dilución óptima del anticuerpo de conejo-anti-rFxn previamente producido, realizando en una curva de calibración con diferentes diluciones de anticuerpo primario y utilizando 1xEC<sub>50</sub>, 2xEC<sub>50</sub> y 4xEC<sub>50</sub> (valores que surgen de la curva de titulación de anticuerpo primario); a su vez, esta comparación se realizó empleando microplacas sensibilizadas con 0,1 µg de rFxn por pocillo, y 1 µg de rFxn por pocillo; la curva de calibración se realizó desde 0,3 µg/ml en adelante, empleando diluciones 1/2, y la dilución de anticuerpo conjugado fue en exceso (1/5.000);
- b) determinar la masa óptima de rFxn inmovilizada en la microplaca; utilizando el mismo diseño mencionado en el punto anterior, se evaluó el rendimiento del sistema empleando 0,1 µg de rFxn por pocillo, y 1 µg de rFxn por pocillo.
- c) definir cuál es el mejor *buffer* de dilución de muestras y estándares de concentración; en esta fase del trabajo se comparó el rendimiento del diluyente formulado a base de PBS-leche en polvo al 3 % (p/v), respecto de PBS-SFB al 10 % (v/v).
- d) evaluar las condiciones de conservación del anticuerpo primario; para ello, se comparó el decaimiento de la curva de titulación de alícuotas congeladas y descongeladas varias veces a lo largo de un intervalo de tiempo (hasta 5 meses), con el resultado de mantener una alícuota a 4 °C en presencia de 50 % de glicerol y azida sódica 0,02 % (p/v).
- e) evaluar qué calidad de microplacas resultan más apropiadas, en relación con la sensibilidad del método y los niveles de analito en muestras de individuos sanos. En esta fase del trabajo, se compararon placas Nunca Maxisorp de alto pegado, con placas Nunca Polisorp de pegado estándar.
- f) estudiar la estabilidad de la Fxn en muestras de sangre anticoagulada mantenida a 4 °C; para ello, se realizó la determinación de Fxn, tal cual fue optimizada en etapas anteriores, sobre muestras de sangre entera sin procesar, conservadas entre 5 y 0 días a 4 °C. Esta determinación se realizó sobre muestras de donantes sanos, apareando el muestreo de modo que ninguna persona deba someterse a la extracción de sangre más de dos veces durante el ensayo.
- g) determinar la reproducibilidad del ensayo; finalmente, la curva de Fxn fue realizada 3 veces en días distintos, por el mismo operador, con la finalidad de estudiar el coeficiente de variación sobre la medición de Fxn. Se analizó el coeficiente de variación de los parámetros de ajuste (asíntota superior, asíntota inferior, punto medio –denominado EC<sub>50</sub>– y pendiente del punto medio).

### Optimización de la obtención de muestras

La extracción de las muestras biológicas de sangre periférica se realizó por venopunción. Para la puesta a punto, se extrajeron muestras de sangre de 3 dadores sanos (de 6 a 10 ml de sangre por donante, en tubos con EDTA). Sobre esas muestras se analizaron los resultados de diferentes tratamientos de la muestra; entre ellos, se comparó el lisado de sangre entera utilizando 1 % NP 40, 10 % glicerol, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM (partes iguales de sangre y *buffer* de lisis), con la medición de proteína en el plasma obtenido por centrifugación (10 minutos a 3.000 rpm). de sangre anticoagulada con EDTA, y en el paquete total de células obtenido por ese mismo proceso de centrifugación. La concentración proteica total de las muestras biológicas se determinó mediante la técnica del ácido bicinconínico [BCA], y los resultados de las mediciones de Fxn se relativizaron al contenido total de proteínas extraídas.

### Determinación de Fxn en la cohorte de voluntarios reclutados

Para el estudio del rendimiento del ensayo diseñado con individuos con ataxia (FRDA y n-FRDA), se siguieron los lineamientos descritos antes. Todas las muestras fueron conservadas durante no más de 3 horas a 4 °C hasta su procesamiento.

La identidad de todos los pacientes quedó protegida por una codificación dependiente de una clave hexadecimal compuesta por las primeras dos letras del nombre, seguidas de las dos primeras letras del apellido, y los cuatro dígitos del año de nacimiento. La base de datos con los nombres de los pacientes quedó bajo el resguardo de los responsables del proyecto en un archivo codificado con clave de seguridad.

Los datos fueron almacenados en una planilla de cálculo, una para la codificación de los individuos estudiados, y otra con los resultados. El tratamiento estadístico de los datos se realizó verificando primero la homogeneidad de las varianzas con el test de Brown-Forsythe, y –considerando que los resultados mostraron diferencias grandes en las varianzas de los datos– luego con un test de Kruskal-Wallis combinado con una comparación, *a posteriori*, en la que se uso el test de Dunn. Estos cálculos fueron realizados con el *software* Graph Pad Prism 6.0.

## Resultados

### Diseño experimental y población

Durante el transcurso de este proyecto, se conformaron tres cohortes: [1] individuos con FRDA, [2] individuos sanos e [3] individuos con ataxias no-FRDA. Estas cohortes quedaron conformadas por 21, 15 y 8 individuos, respectivamente.

Entre los pacientes con ataxias no-FRDA hubo 5 casos de Ataxia Espinocerebelosa (SCA), un caso de Atrofia Muscular, un caso de ataxia por gluten y un caso de paraparesia espástica. La Tabla I resume las características principales de los voluntarios reclutados.

### Producción de Fxn recombinante

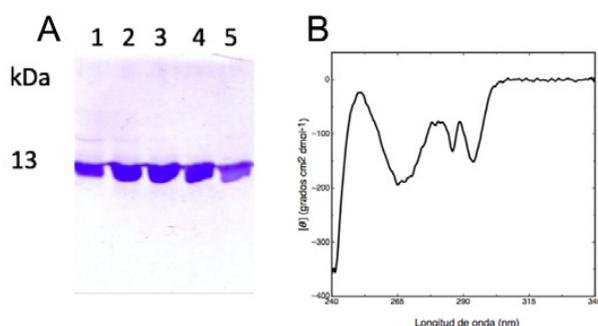
La preparación de rFxn fue realizada conforme lo indicado en la sección de Materiales y Métodos. Como resultado, se obtuvo una proteína de aproximadamente 13 kDa, estable y con alto grado de pureza electroforética, tal como se observa en la Figura 2. La proteína mostró un grado de pureza superior al 98 %, y una concentración de alrededor de 1,2 mg/ml. La proteína fue fraccionada y mantenida a -20 °C hasta el momento de su uso. La masa teórica de la proteína purificada y obtenida experimentalmente por ESI-ES coincide perfectamente (13605,15 y 13604,92 Da, respectivamente) indicando la ausencia de modificaciones postraduccionales o proteólisis. El espectro de CD en el UV cercano obtenido es compatible con el esperado para esta variante de Fxn, en su conformación nativa y superponible con los espectros publicados previamente [33]. Es importante notar que las señales de CD en este rango del espectro UV provienen de la existencia de residuos aromáticos de Phe, Tyr y Trp en entornos asimétricos, resultado de la rigidez de la estructura terciaria de la proteína. El espectro de CD en el UV cercano puede considerarse como una “huella digital” del estado conformacional de la proteína purificada.

### Producción de anticuerpos anti rFxn

Conforme a lo descrito, los conejos recibieron 6 dosis de 100 µg de proteína rFxn purificada, en adyuvante completo de Freund, a razón de una dosis por semana. Al cabo de ese tiempo se obtuvieron muestras por punción de la arteria auricular, y la sangre así obtenida fue dejada coagular. El suero se separó por centrifugación y se tituló por ELISA. Los resultados de esa titulación se observan en la figura 3 A (conejo #1) y B (conejo #2), donde se aprecian las curvas de titulación de cuatro sangrías exploratorias (S1 a S4) y de la sangría final (SF).

En las figuras 3 C y D se observan los valores del parámetro EC50, utilizado aquí como indicador del título (en ausen-

**Figura 2.** Resultado de la purificación de la proteína Fxn recombinante.

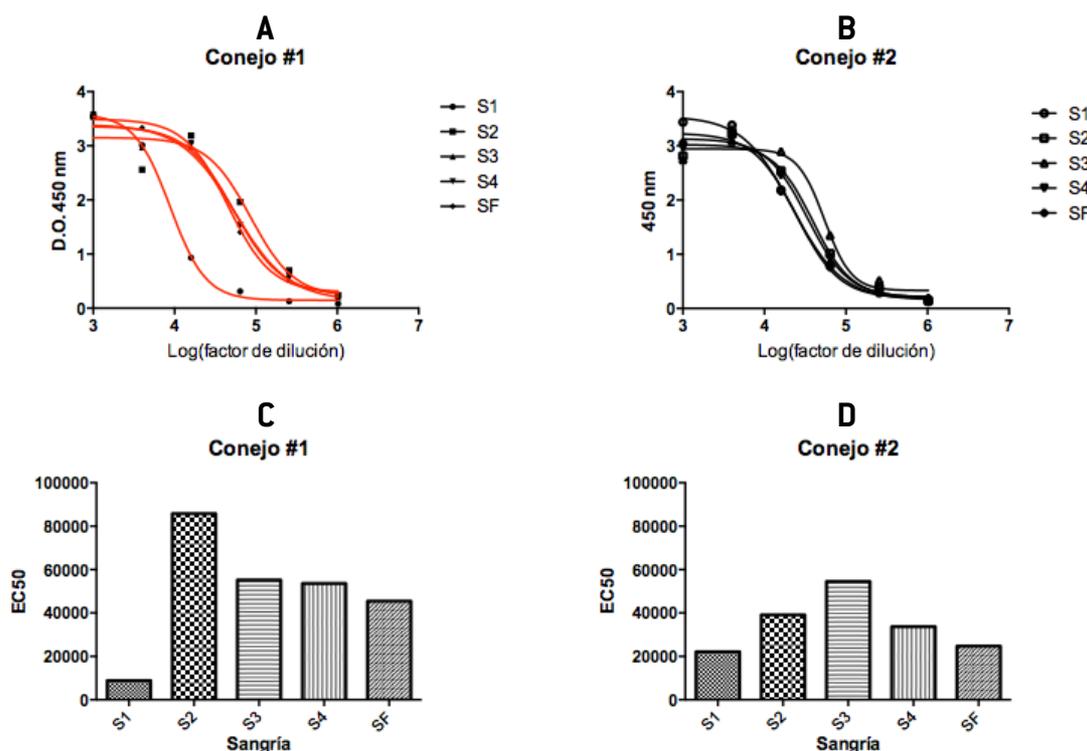


- La figura muestra el resultado de la purificación de rFxn. En el panel A se observan las bandas correspondientes a las sucesivas eluciones de la proteína purificada (calles 1 a 5); a la izquierda se consigna el valor aproximado del peso molecular (13 kDa). En el panel B se muestra un espectro de CD en el UV cercano de la proteína purificada.

**Tabla I.** Resumen de las características de los reclutados.

#	Paciente	Signos	Mutación	Institución	Condición	Fxn (pg/μg)
1	DAOJ1979	AT, ES	Expansión	FLENI	FRDA	0
2	LER01986	AT, ES	Expansión	FLENI	FRDA	0
3	ROMA1968	AT, CA, ES	Expansión	FLENI	FRDA	0
4	NONA1962	AT, CA, ES	Expansión	FLENI	FRDA	299
5	AGM01996	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
6	LADV2001	AT	Expansión	FLENI	FRDA	32
7	ANDV1989	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
8	NIBA1986	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
9	GIBA1990	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
10	DIDE1972	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	0
11	ANDE1976	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	11
12	NIRA1970	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	0
13	MAG01995	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	104
14	JALA1996	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	4
15	VIBE1986	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
16	GLBE1966	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
17	JOBE1963	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
18	ABCH1970	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
19	ALCH1966	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
20	JUOL1951	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
21	FRIP2002	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
22	SOHI1989	---	---	---	Sano	654
23	NAFA1988	---	---	---	Sano	666
24	AIDI1990	---	---	---	Sano	671
25	DAGO1978	---	---	---	Sano	781
26	ADFR1990	---	---	---	Sano	376
27	ALFE1980	---	---	---	Sano	655
28	ELCE1988	---	---	---	Sano	1031
29	MAM01988	---	---	---	Sano	1024
30	MALE1988	---	---	---	Sano	697
31	MAPA1979	---	---	---	Sano	1071
32	MACA1976	---	---	---	Sano	1149
33	JASA1974	---	---	---	Sano	533
34	ERR01979	---	---	---	Sano	798
35	SAFA1988	---	---	---	Sano	707
36	LUDE1988	---	---	---	Sano	1491
37	ESM01984	AM	---	Htal. Clínicas	AM	773
38	JUSA1981	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	437
39	MIAR1969	AT	---	Htal. Clínicas	AG	379
40	RUDA1963	AT	---	Htal. Clínicas	PE	2857
41	NET01961	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	673
42	FRVE1981	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	171
43	MIES1976	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	923
44	JOS01970	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	441

► La columna de "signos" se refiere a los signos clínicos más relevantes, como son: ataxia (AT), atrofia muscular (AM), escoliosis (ES) y cardiopatía (CA). La columna "condición" se refiere a la etiología de la patología, e incluye individuos con ataxia de Friedreich (FRDA), con atrofia muscular (AM), ataxia por gluten (AG), paraparesia espástica (PE) y ataxia espinocerebelosa (SCA).

**Figura 3.** Curvas de titulación de sueros de conejo anti rFxn.

► La figura muestra el resultado de la titulación de los sueros de conejos hiperinmunes contra rFxn [panel A, conejo #1; panel B, conejo #2]. Se observa que salvo la primera sangría del conejo #1, todas las fracciones de suero colectadas presentan un título que está por encima de 10.000, utilizando el parámetro EC50 (punto de inflexión de la curva sigmoidea de 4P), como indicador relativo del título. En los paneles C y D se muestra el valor del título [EC50] obtenido a partir de las curvas de titulación de la figura anterior. Se observa que el suero correspondiente al conejo #1 presentó valores superiores en todos los tiempos de sangría, salvo en la primera.

cia de un valor de corte]. Esas figuras muestran que el título obtenido para los sueros correspondientes a ambos conejos no fue equivalente. El suero así obtenido fue fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Alícuotas de uso se conservaron a  $4-8^{\circ}\text{C}$  en azida sódica y 50% v/v de glicerol.

### Optimización del EIA

Una vez obtenida la fuente de anticuerpos específicos para rFxn (suero de conejo hiperinmune) se procedió a optimizar un protocolo de competencia con preincubación en fase heterogénea. Esta estrategia demostró ser sencilla y relativamente económica, por requerir un único anticuerpo específico no comercial.

A continuación, se describen los principales hallazgos durante la puesta a punto de la metodología, tal como se comentó en la sección de materiales y métodos.

#### a. Dilución óptima del anticuerpo anti-rFxn producido en conejo.

Considerando los datos bibliográficos y la propia experiencia, se eligió una dilución inicial de uso del anticuerpo primario que coincidía con el punto de inflexión de la curva sigmoidea de 4 parámetros, valor al que se denomina EC50 (interacción del anti-rFxn con fase sólida).

A partir del análisis de las curvas de titulación que aparecen en la figuras 2, se determinó ese valor en  $1 / 40.000$

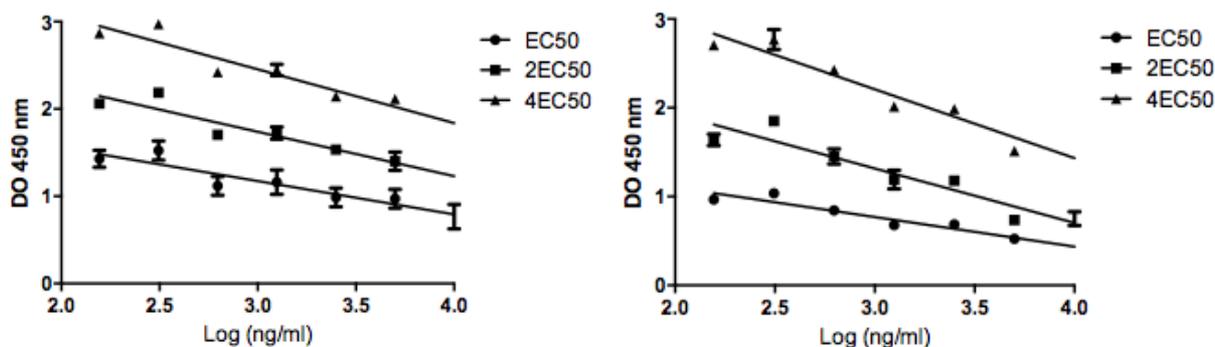
(vale recordar que los sueros que conforman la mezcla definitiva no fueron mezclados en volúmenes iguales, y que el título final predominante es el del conejo #1, por ser las fracciones de volumen preponderante).

Para la selección final de la dilución de anticuerpo que se usará en el ensayo definitivo, se realizó un ensayo de competencia [tal como fue relatado con anterioridad], en el que se emplearon dos concentraciones de rFxn ( $0,1 \mu\text{g/pocillo}$  y  $1 \mu\text{g/pocillo}$ ) unida a la placa, y tres diluciones distintas de suero conejo-anti-rFxn ( $1 \times \text{EC}50$ ,  $2 \times \text{EC}50$  y  $4 \times \text{EC}50$ ), valorando una serie de concentraciones de rFxn estándar soluble desde  $150 \text{ ng/ml}$  en adelante. Los resultados se muestran en las figuras 4 A y B.

En ambos paneles se observa una relación lógica entre las diferentes diluciones de anticuerpo primario (a mayor concentración del anticuerpo, mayor señal), así como una forma lógica para un ensayo competitivo (a mayor concentración de analito en fase líquida, menor señal final). En ambos gráficos se observa que la dilución  $1 \times \text{EC}50$  provoca una señal máxima cercana a  $\text{abs} = 1$  a  $450 \text{ nm}$ , algo que resulta óptimo en términos de la linealidad de la relación entre la señal y la concentración de analito, en términos de la Ley de Lambert y Beer. Por ese motivo, se decidió trabajar con  $1 \times \text{EC}50$ .

#### b. Masa de rFxn inmovilizada en la microplaca

**Figura 4.** Puesta a punto de la dilución de anticuerpo primario.



► Calibración de la dilución de anticuerpo primario en el ensayo competitivo. Se observan dos cantidades de antígeno sensibilizante, y tres diluciones posibles para el anticuerpo primario. La dilución del anticuerpo conjugado fue siempre la misma [1/5.000].

En relación con la masa de rFxn inmovilizada en la microplaca, las propias Figuras 4 A y B muestran que el incremento en 10 veces la masa de rFxn provoca un aumento proporcional de la señal inferior a lo esperado. En ese contexto, y bajo la premisa bibliográfica de que en los ensayos competitivos la interacción del anticuerpo con el antígeno en fase sólida puede estar privilegiada con respecto a la interacción en fase líquida, se decidió trabajar con la mínima concentración de rFxn, suficiente para proporcionar una señal final significativa [0,1 µg/pocillo].

*c. Buffer de dilución de muestras y estándares de concentración*

De acuerdo con la experiencia previa y con la bibliografía referida al tema, se identificaron dos diluyentes posibles para el ensayo, cuya misión es disminuir las interacciones inespecíficas proteína-proteína y, en consecuencia, minimizar el ruido analítico. Utilizando una dilución de 1xEC50 y 0,1 µg/pocillo de rFXN, se comparó el resultado de diluir los anticuerpos y muestras en PBS + leche descremada en polvo al 3 % p/v, con respecto a PBS + 10 % v/v Suero Fetal Bovino. Los resultados se muestran en la figura 5.

El análisis de la figura muestra que, aunque la forma de las curvas es equivalente, la diferencia entre la asínto-

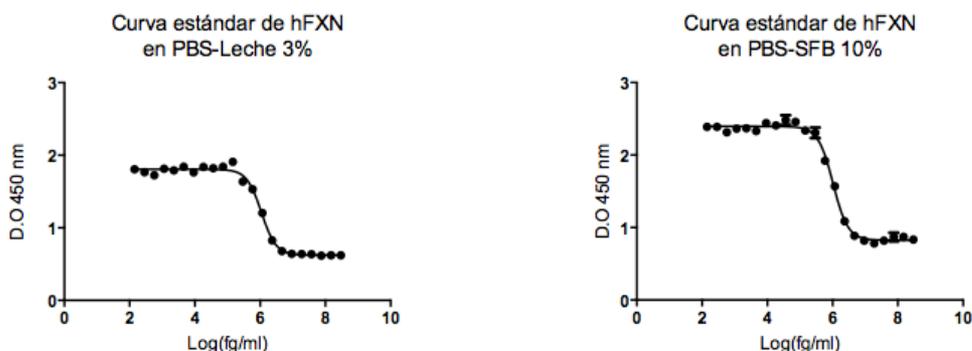
ta máxima y la mínima es considerablemente mayor en el caso del diluyente formulado a base de PBS + SFB 10 % v/v. Por ese motivo, se seleccionó ese diluyente para todos los ensayos posteriores.

*d. Condiciones de conservación del anticuerpo primario*

Considerando la periodicidad con la que el ensayo se iba a realizar [esporádicamente], se decidió evaluar el efecto del uso de una misma fracción de anticuerpos, congelándola y descongelándola cada vez. En la figura 6 se observa claramente una disminución de la señal máxima del título con los ciclos de congelado/descongelado, poniendo en evidencia la necesidad de implementar medidas de preservación.

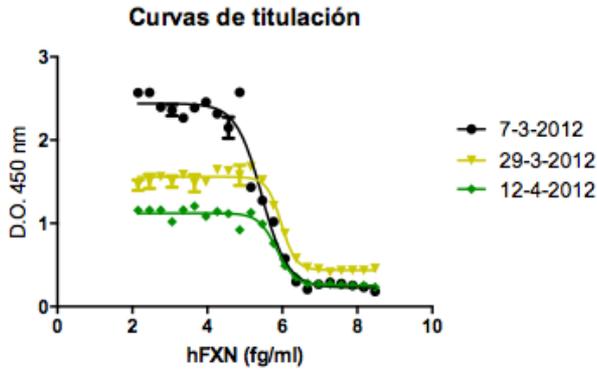
Además, se realizó un experimento control en el que se estudió el efecto de mantener una alícuota durante el mismo período de tiempo que en el ensayo anterior, (35 días) a -20 °C o a 4 °C en presencia de glicerol y azida sódica. Esta última formulación permite evitar los ciclos de congelado y descongelado que, como es sabido, deterioran la actividad del anticuerpo, mientras que la primera permite tener un control de la actividad del anticuerpo congelado. Los resultados se observan en la figura 7, y muestran que una alícuota conservada en presencia de azida sódica y glicerol, retiene prácticamente la misma actividad de anticuerpo que la

**Figura 5.** Comparación de diluyentes de anticuerpos y muestras.



► En la figura se observan las curvas de titulación del mismo suero hiperinmune, contra el mismo antígeno en la misma concentración; la única diferencia fue la composición del buffer diluyente.

**Figura 6.** Estabilidad del anticuerpo primario.



► El gráfico muestra el decaimiento en la actividad de anticuerpo 3 (29 - 3 - 2012) y 5 (12 - 4 - 2012) semanas después de la titulación inicial (7 - 3 - 2012). Estas alícuotas fueron descongeladas 1, 2 y 3 veces respectivamente.

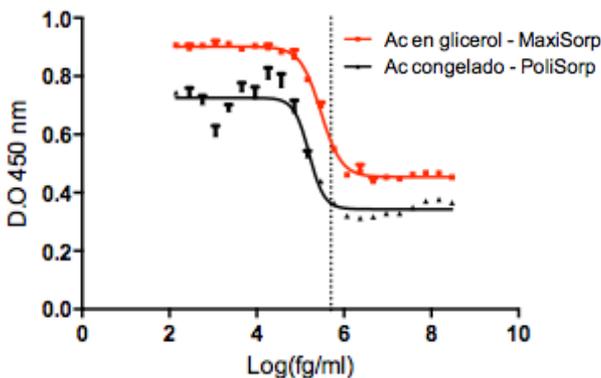
alícuota control conservada a -20 °C.

*e. Calidad de microplacas*

Finalmente, en términos de la puesta a punto del ensayo, se comparó el resultado de utilizar placas de alta capacidad de unión (Nunc MaxiSorp certificadas) con placas de capacidad baja (Nunc PoliSorp, sin certificar). Los resultados de esta experiencia se observan en la figura 8, y muestran que efectivamente el rendimiento del ensayo es considerablemente mejor en las placas de alta unión. Considerando el uso de la determinación, se decidió optar por las placas MaxiSorp certificadas.

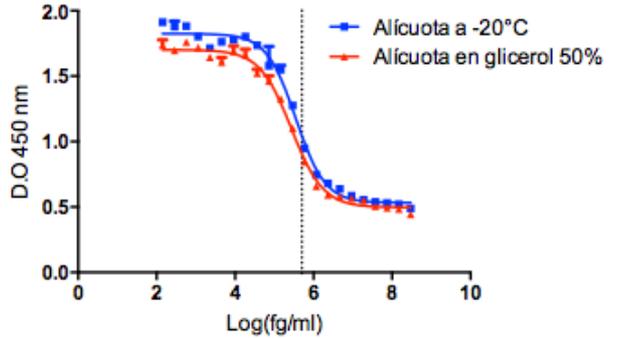
Se convocaron 10 donantes de sangre voluntarios, a quienes se les tomó una muestra el día del ensayo (día 0), y una muestra entre 5 y 1 días antes del ensayo (5 grupos de dos individuos cada uno). Cada una de las muestras fue mantenida a 4 °C hasta el día 0, momento en el que fueron procesadas para la extracción de proteínas, y sometidas a la determinación de proteínas totales y de Fxn. Los resultados fueron expresados en términos de la recuperación

**Figura 8.** Comparación del rendimiento en función de la calidad de las microplacas.



► En la figura se observan las curvas de titulación correspondientes a dos categorías de microplacas de una misma marca (Nunc).

**Figura 7.** Comparación de estrategias de conservación del anticuerpo primario.



► En la Figura se observan las curvas de titulación en las condiciones experimentales elegidas, para una alícuota mantenida en glicerol y temperatura ambiente, y otra alícuota mantenida a -20 °C sin descongelar.

porcentual de Fxn, y todos los datos fueron combinados en un único gráfico, que es el que se muestra en la figura 9. En dicha figura se observa que en 3 días se produce un descenso de un 20 % en la concentración de Fxn, lo que implica un descenso del 6,7 % diario.

*f. Determinación del coeficiente de variación de la medición entre ensayos.*

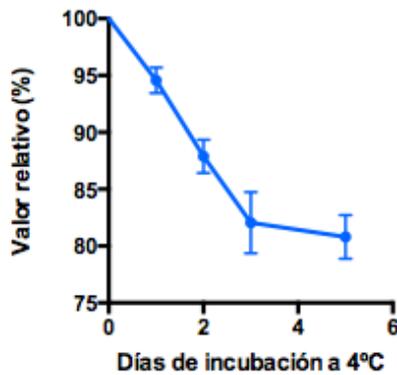
Luego de optimizar las condiciones de ensayo, se realizaron tres experimentos (curvas de calibración) de modo independiente, en días diferentes, por el mismo operador. En cada experimento, se valoró también una muestra normal de un donante voluntario. El resultado de analizar la misma muestra en los tres experimentos arrojó un coeficiente de variación porcentual del 19 %.

*Puesta a punto de obtención y procesamiento de las muestras*

Tal como se describió en el apartado de materiales y métodos, considerando los parámetros optimizados (masa de proteína recombinante recubriendo la placa, dilución de

**Figura 9.** Recuperación porcentual de Fxn en función de la conservación de la muestra a 4°C.

**Recuperación de Fxn en muestras a 4°C**

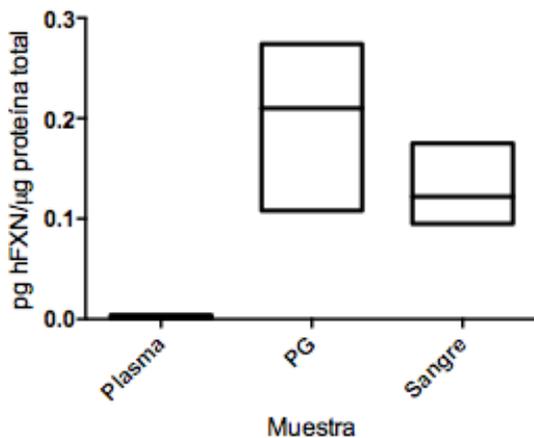


► La f  
día:  
a 4'

► los  
ulada  
de la

obtención (día 0, 100% de señal).

**Figura 10.** Comparación de la recuperación de Fxn en muestras normales.



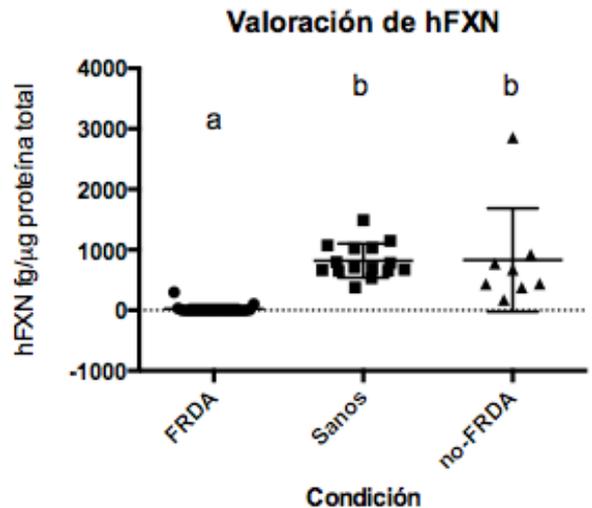
► Valores de Fxn expresados en relación con el contenido total de proteínas de la muestra, para tres tipos de tratamiento de la muestra. En la figura se observa un gráfico de cajas y bigotes, aunque debe destacarse que en esta fase de optimización los datos por grupo son 3 (tres). Se observa el resultado obtenido con plasma, paquete globular (PG) y sangre entera.

anticuerpo primario, calidad de microplacas y diluyente], se procedió a realizar la medición de Fxn en 3 muestras de donantes sanos, sin ataxia ni antecedentes familiares, conforme lo relatado en el apartado de conformación de los grupos de individuos reclutados. Las muestras fueron obtenidas como se indicó previamente, y se separaron en tres fracciones: sangre entera, plasma anticoagulado, y paquete celular obtenido por centrifugación. En la figura 10 se observa el resultado, que indica que no hay Fxn libre en plasma, y que la utilización del paquete globular aumenta levemente los valores obtenidos. Esta diferencia posiblemente sea como consecuencia de la eliminación de las proteínas del plasma, que no aportan Fxn pero influyen en la expresión de resultados (incrementando el valor del divisor), a expensas de la coherencia de los datos (aumenta la dispersión de los valores). En consecuencia, se decidió que toda muestra recibida sería procesada “en fresco”, realizando la extracción de proteínas de sangre total mediante el uso del *buffer* de lisis antes descrito, y las fracciones así obtenidas serían conservadas en nitrógeno líquido hasta su uso.

#### Determinación de Fxn en la cohorte de individuos reclutados

Para validar la metodología en términos analíticos, se realizó la medición en la cohorte de pacientes reclutados, utilizando la metodología optimizada en las etapas anteriores. Todas las muestras fueron procesadas en un único ensayo, y los resultados se resumen en la figura 9. Estos muestran una disminución clara en la concentración de Fxn, detectada en muestras de sangre entera de individuos con FRDA, con respecto a la concentración en muestras de individuos de ambos grupos control (sanos y pacientes con

**Figura 11.** Determinación de Fxn en muestras de individuos sanos, FRDA y con ataxia no-FRDA.



► Valores de Fxn expresados en forma relativa a la masa total de proteínas de la muestra (sangre entera lisada), para los tres grupos de individuos. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica) sobre los datos, y un test de Dunn a posteriori. Las letras indican las diferencias significativas, utilizando un test de Tukey con  $\alpha = 0,05$ .

ataxia no-FRDA).

#### Discusión

En términos de la proteína rFxn, los resultados muestran que se logró producir con alta pureza y en un excelente nivel de expresión. Vale la pena mencionar que la variante de longitud completa rFxn1-210 se expresa con niveles muy por debajo con respecto a la variante elegida para este trabajo. Sumado a eso, la versión de longitud completa es mucho más propensa a agregar que la versión 90 - 210, por lo que claramente la rFxn empleada en este trabajo posee características que la vuelven sustancialmente superior que la primera. Los estudios biofísicos confirmaron la identidad y cualidades óptimas para ser utilizada como inmunógeno y como estándar de concentración. Estos estudios biofísicos fueron establecidos como los controles rutinarios a ser realizados sobre cada nuevo lote de rFxn producido, a modo de control de calidad.

La inmunización de conejos con dicho estándar en presencia del adyuvante proporcionó una buena respuesta inmunológica, tal como lo revelan las curvas de titulación de los sueros por ELISA. Dichos títulos fueron cruciales para conseguir alta sensibilidad en el método.

En relación con el proceso de optimización, y como resultado de los diferentes ensayos realizados, se concluyó que las microplacas deben ser de alto pegado, que la sensibilización debe realizarse con 0,1  $\mu$ g de rFxn por pocillo, la dilución del anticuerpo primario debe ser 1xEC50, el diluyente debe ser PBS-SFB 10 %, y la conservación del anticuerpo puede realizarse a 4 °C en presencia de glicerol 50 % y azida sódica 0,02 % p/v. Asimismo, durante esa puesta a punto se concluyó que la muestra de sangre entera es apta para su procesamiento.

**Tabla II.** Resultados de la determinación de FRDA por ELISA y test genético.

ELISA	Test genético		
		FRDA	no-FRDA
FRDA		21	1
no-FRDA		0	22

► La tabla resume los resultados mostrados en la Figura 11, identificando verdaderos y falsos positivos del método de ELISA, así como verdaderos y falsos negativos de ese método.

Finalmente, en términos de los grupos de individuos, se observó que todos los pacientes con FRDA diagnosticada poseen cantidades de Fxn menores a 350 fg Fxn por  $\mu\text{g}$  de proteína total [350 fg/ $\mu\text{g}$ ]. En contraposición, se comprobó que todos los individuos sanos tuvieron valores superiores a esta cifra, y que solo uno de los 10 individuos con ataxias no-FRDA tuvo valores menores a esa cifra. La Tabla II muestra el agrupamiento de datos para el cálculo de la sensibilidad y especificidad analíticas.

De acuerdo con esta Tabla, la sensibilidad del método desarrollado, en relación con la identificación de pacientes con FRDA, es del 100 %, mientras que la especificidad es 95,7 %, pues uno de los 10 individuos con ataxia no-FRDA quedó clasificado como un falso positivo por ELISA.

En conclusión, el método desarrollado es útil para la medición de Fxn en muestras de sangre periférica, y puede ser utilizado como prueba complementaria en el diagnóstico, o herramienta de seguimiento. No obstante, el método diagnóstico de referencia es la prueba genética, y el método aquí descrito no resulta concluyente por sí solo.

#### Conflicto de intereses:

Financiamiento: este trabajo fue parcialmente financiado con fondos UBACYT-PDE 2015.

#### Referencias bibliográficas

1. Delatycki MB, Corben LA. Clinical features of Friedreich ataxia. *J Child Neurol* 2012;27:1133-7.
2. Pandolfo M. Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol* 2009;256(Suppl 1):3-8.
3. Pandolfo M. Friedreich ataxia. *Semin Pediatr Neurol* 2003;10:163-172.
4. Lane DJ, Richardson DR. Frataxin, a molecule of mystery: trading stability for function in its iron-binding site. *Biochem J* 2010;426:e1-3.
5. Prischi F, Konarev PV, Iannuzzi C, Pastore C, Adinolfi S, Martin SR, et al. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat Commun* 2010;1:95.
6. Qi W, Cowan JA. A structural and functional homolog supports a general role for frataxin in cellular iron chemistry. *Chem Commun (Camb)* 2010;46:719-721.
7. Roman EA, Faraj SE, Cousido-Siah A, Mitschler A, Podjarny A, Santos J. Frataxin from *Psychromonas ingrahamii* as a model to study stability modulation within the CyaY protein family. *Biochim Biophys Acta* 2013;1834:1168-80.
8. Roman EA, Faraj SE, Gallo M, Salvay AG, Ferreiro DU, Santos J. Protein stability and dynamics modulation: the case of human frataxin. *PLoS One* 2012;7:e45743.
9. Stemmler TL, Lesuisse E, Pain D, Dancis A. Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *J Biol Chem* 2010;285:26737-26743.
10. Tsai CL, Barondeau DP. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* 2010 49:9132-9139.
11. Ye H, Rouault TA. Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* 2010;49:4945-4956.
12. Yoon T, Cowan JA. Frataxin-mediated iron delivery to ferroxidase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* 2004;279:25943-25946.
13. Pandolfo M. The molecular basis of Friedreich ataxia. *Neurologia* 2000;15:325-329.
14. Pandolfo M. Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion* 2002;2:87-93.
15. Pandolfo M. Iron and Friedreich ataxia. *J Neural Transm Suppl* 2006;70:143-146.
16. Pandolfo M, Pastore A. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J Neurol* 2009;256(Suppl 1) 9-17.
17. Saccà F, Marsili A, Puorro G, Antenora A, Pane C, Tessa A, et al. Clinical use of frataxin measurement in a patient with a novel deletion in the FXN gene. *J Neurol* 2012;260:1116-21.
18. Patel PI, Isaya G. Friedreich ataxia: from GAA triplet-repeat expansion to frataxin deficiency. *Am J Hum Genet* 2001 69:15-24.
19. Soragni E, Herman D, Dent SY, Gottesfeld JM, Wells RD, Napierala M. Long intronic GAA\*TTC repeats induce epigenetic changes and reporter gene silencing in a molecular model of Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res* 2008;36:6056-6065.
20. Baralle M, Pastor T, Bussani E, Pagani F. Influence of Friedreich ataxia GAA noncoding repeat expansions on pre-mRNA processing. *Am J Hum Genet* 2008;83:77-88.
21. Lazaropoulos M, Dong Y, Clark E, Greeley NR, Seyer LA, Brigatti KW, et al. Frataxin levels in peripheral tissue in Friedreich ataxia. *Ann Clin Transl Neurol* 2015;2:831-42.
22. Herman D, Jenssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol* 2006;2:551-558.
23. Kim MJ, Kim DW, Jeong HJ, Sohn EJ, Shin MJ, Ahn EH et al. Tat-Frataxin protects dopaminergic neuronal cells against MPTP-induced toxicity in a mouse model of Parkinson's disease. *Biochimie* 2012;94:2448-56.

24. Rai M, Soragni E, Chou CJ, Barnes G, Jones S, Rusche JR et al. Two new pimelic diphenylamide HDAC inhibitors induce sustained frataxin upregulation in cells from Friedreich's ataxia patients and in a mouse model, *PLoS One* 2010;5:e8825.
25. Rai M, Soragni E, Jenssen K, Burnett R, Herman D, Coppola G, et al. HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model, *PLoS One* 2008;3:e1958.
26. Sandi C, Pinto RM, Al-Mahdawi S, Ezzatizadeh V, Barnes G, Jones S, et al. Prolonged treatment with pimelic o-amino-benzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model, *Neurobiol Dis* 2011;42:496-505.
27. Soragni E, Xu C, Cooper A, Plasterer HL, Rusche JR, Gottesfeld JM. Evaluation of histone deacetylase inhibitors as therapeutics for neurodegenerative diseases, *Methods Mol Biol* 2001 793:495-508.
28. Tsou AY, Friedman LS, Wilson RB, Lynch DR. Pharmacotherapy for Friedreich ataxia, *CNS Drugs* 2009;23:213-223.
29. Xu C, Soragni E, Chou CJ, Herman D, Plasterer HL, Rusche JR, et al. Chemical probes identify a role for histone deacetylase 3 in Friedreich's ataxia gene silencing, *Chem Biol* 2009;16:980-989.
30. Vyas PM, Tomamichel WJ, Pride PM, Babbey CM, Wang Q, Mercier J, et al. A TAT-frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum Mol Genet* 2012;21:1230-47
31. Saccà F, Marsili A, Puorro G, Antenora A, Pane C, Tessa A, et al. Clinical use of frataxin measurement in a patient with a novel deletion in the FXN gene. *J Neurol* 2013;260:1116-21.
32. Pandolfo M. Friedreich ataxia: Detection of GAA repeat expansions and frataxin point mutations, *Methods Mol Med* 2006;126:197-216.
33. Correia AR, Adinolfi S, Pastore A, Gomes CM. Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding, *Biochem J* 2006;398:605-611