

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

EXPRESIÓN DE HMGB1 Y SU RECEPTOR TLR2 EN MODELOS CELULARES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Palmieri, Mateo – LU1098306

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Caruso, Carla

Instituto de Investigaciones Biomédicas - UBA-CONICET

Co-Tutor:

Mahmoud, Yamil Damián

UADE

29 de mayo, 2023

UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

Resumen

La enfermedad de Huntington (HD) es un trastorno genético neurodegenerativo que provoca disfunciones del movimiento, cognitivas y del comportamiento. La causa de la HD es una mutación en un gen específico llamado Huntingtina (*Htt*), que conduce a una expansión de los tripletes CAG en el exón 1. Aunque los investigadores han avanzado en la comprensión de la HD, aún se desconoce el mecanismo exacto por el que la mutación conduce a la enfermedad. Dentro de los mecanismos patogénicos de la HD se encuentra la disfunción mitocondrial. La toxina ácido 3-nitropropiónico (3NP) genera disfunción mitocondrial y estrés oxidativo de forma similar a la HD. En células gliales, que sostienen y protegen a las neuronas, el estrés oxidativo puede provocar una respuesta inflamatoria. HMGB1 (*High-mobility group box 1*) es una proteína que se encuentra en el núcleo de las células, regula la expresión génica y participa en la reparación del ADN. HMGB1 puede ser liberado por células dañadas o células inmunitarias, donde puede unirse a receptores como los receptores tipo toll (TLR) TLR2, TLR4 y receptores de productos finales de glicación avanzada (RAGE) y desencadenar una respuesta inflamatoria. Se desconoce si las células gliales modulan la expresión y/o liberación de HMGB1 en la HD. En este estudio, investigamos la expresión de HMGB1 y sus receptores en un modelo de HD, el ratón Q175. La expresión de HMGB1 y sus receptores fue determinada en cultivos de astrocitos y microglía de corteza de ratones tipo salvaje (WT del inglés *wild type*) y HD. Demostramos que la expresión de HMGB1 y TLR4 aumenta en microglía HD y no en astrocitos HD sin tratar, mientras que la expresión de TLR2 en astrocitos y microglía no se modifica. Estudiamos C1q una proteína del complemento involucrada en la inflamación que puede interactuar con HMGB1. La expresión de C1qA solo se detectó en microglía y no mostró diferencias entre microglía de corteza WT y HD. Nuestros hallazgos muestran que la privación de suero aumenta la expresión de HMGB1 en astrocitos y microglía HD, mientras que la exposición a la toxina mitocondrial 3NP aumenta los niveles de HMGB1 solo en microglía HD. Por lo tanto, estos resultados indican que HMGB1 y su receptor TLR4 aumenta en la glía HD y que este efecto podría estar relacionado con la inflamación a través de la regulación de HMGB1 en microglía mientras que TLR2 y C1q no desempeñarían un papel importante en la inflamación relacionada con la HD. Estos hallazgos podrían contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos de la HD y a identificar nuevos objetivos terapéuticos para esta enfermedad neurodegenerativa.

Abstract

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative genetic disorder that causes movement, cognitive, and behavioral dysfunctions. The cause of HD is a mutation in a specific gene called Huntingtin (*Htt*), which leads to an expansion of CAG triplets in exon 1. Although researchers have made progress in understanding HD, the exact mechanism by which the mutation leads to the disease is still unknown. One of the pathogenic mechanisms of HD is mitochondrial dysfunction. The 3-nitropropionic acid (3NP) toxin generates mitochondrial dysfunction and oxidative stress similar to Huntington's disease (HD). In glial cells, which support and protect neurons, oxidative stress can cause an inflammatory response. HMGB1 (High-mobility group box 1) is a protein found in the nucleus of cells that regulates gene expression and participates in DNA repair. HMGB1 can be released by damaged cells or immune cells, where it can bind to receptors such as toll-like receptors (TLR) TLR2, TLR4, and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and trigger an inflammatory response. It is unknown if glial cells can modulate the expression and/or release of HMGB1 in HD. In this study, we investigated the expression of HMGB1 and its receptors in an HD model, the Q175 mouse. The expression of HMGB1 and its receptors was determined in cultures of astrocytes and microglia from wild-type (WT) and HD mice cortex. We demonstrated that the expression of HMGB1 and TLR4 increases in HD microglia but not in untreated HD astrocytes, while the expression of TLR2 in astrocytes and microglia remains unchanged. We evaluated C1q, a complement protein involved in inflammation that can interact with HMGB1. The expression of C1qA was detected only in microglia and WT and HD cortex microglia showed no differences in C1qA expression. Our findings show that serum deprivation increases the expression of HMGB1 in astrocytes and HD microglia, while exposure to the mitochondrial toxin 3NP only increases HMGB1 levels in HD microglia. Therefore, these results indicate that HMGB1 and its receptor TLR4 increase in HD glia and that this effect could be related to inflammation through the regulation of HMGB1 in microglia, while TLR2 and C1q would not play a significant role in HD-related inflammation. These findings could contribute to a better understanding of the pathogenic mechanisms of HD and to identifying new therapeutic targets for this neurodegenerative disease.

Contenidos

<i>Lista de Siglas</i>	4
<i>1. Introducción</i>	6
1.1 Enfermedad de Huntington	6
1.2 Ácido 3-nitropropiónico.....	7
1.3 Microglía	8
1.4 Astrocitos	8
1.5 HMGB1.....	9
1.6 C1q11	
1.7 Toll-Like Receptors.....	12
1.8 Modelo de la enfermedad de Huntington	12
1.9 Objetivos	12
<i>2. Antecedentes</i>	13
<i>3. Hipótesis</i>	18
<i>4. Metodología</i>	19
4.1 Materiales.....	19
4.2 Animales	19
4.3 Genotipificación.....	19
4.4 Cultivos primarios de astrocitos y microglía.....	20
4.5 Caracterización de las poblaciones de astrocitos	22
4.6 Caracterización de las poblaciones de microglía	22
4.7 Extracto de proteínas totales.....	23
4.8 Western Blot	24
4.9 Análisis estadístico	24
<i>5. Resultados</i>	26
5.1 Puesta a punto de cultivos primarios de astrocitos y microglía	26
5.2 Inmunocitoquímica de astrocitos y microglía.....	28
5.3 Astrocitos	29
5.5 Microglía.....	33
<i>6. Discusión</i>	36
<i>7. Conclusión</i>	39
<i>8. Bibliografía</i>	41

Lista de Siglas

HD: Enfermedad de Huntington: Es un trastorno neurodegenerativo hereditario caracterizado por la degeneración progresiva de las células nerviosas en ciertas áreas del cerebro.

Htt: Gen de la huntingtina: Corresponde al gen que codifica la proteína llamada huntingtina, cuya mutación está asociada con la enfermedad de Huntington. La mutación en el gen *Htt* resulta en una forma anormal y tóxica de la huntingtina.

mHtt: Gen de la huntingtina mutado: Se refiere al gen mutado de la huntingtina, presente en personas con la enfermedad de Huntington. La forma mutada de la huntingtina se caracteriza por una expansión anormal de trinucleótidos CAG, lo que conduce a la producción de una proteína defectuosa y tóxica.

HMGB1: High Mobility Group Box 1: Es una proteína nuclear que puede ser liberada al medio extracelular en respuesta a la inflamación o daño celular. HMGB1 desempeña un papel en la regulación de la respuesta inmunológica y la inflamación en diversas enfermedades.

TLR: Toll-like receptor: Son un grupo de receptores presentes en las células del sistema inmunológico que reconocen patrones moleculares asociados con patógenos. Los TLR desempeñan un papel crucial en la activación de respuestas inmunológicas frente a infecciones y desempeñan un papel en la detección de daño tisular.

3NP: Ácido 3-nitropropiónico: Es un compuesto químico que se utiliza experimentalmente para inducir daño cerebral y replicar algunos aspectos de la enfermedad de Huntington en modelos animales. El 3NP inhibe la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, provocando disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en las células del cerebro.

IL-6: Interleucina 6: Proteína proinflamatoria que regula la respuesta inflamatoria y la función inmune. Es producida por diferentes células, como los leucocitos, los macrófagos, las células endoteliales y células gliales.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa: Citocina proinflamatoria que regula la respuesta inmunitaria y está implicada en enfermedades autoinmunes. Se encuentra principalmente en los macrófagos y otros tipos de células inmunitarias.

SNC: Sistema Nervioso Central: Comprende el cerebro y la médula espinal, y controla funciones motoras y cognitivas.

GFAP: del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*: Proteína encontrada en astrocitos que proporciona soporte estructural y se usa como marcador en estudios cerebrales.

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD del Inglés *Huntington's disease*) es una enfermedad autosómica dominante que causa un trastorno neurodegenerativo cuyo inicio se produce en la edad adulta con un curso progresivo de síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos. Es causada por la expansión de repeticiones CAG en el gen de la Huntingtina (*Htt*) que conduce a una región de poliglutaminas expandida en el exón 1 de la proteína. Esta región exhibe polimorfismo en el número de repeticiones de CAG; por debajo de 35 repeticiones CAG los individuos son normales, 35-39 repeticiones CAG, la penetrancia de HD es incompleta y en repeticiones superiores a 40 CAG, la penetrancia es completa.

La edad promedio de inicio de HD en los pacientes es alrededor de 45 años; cuanto mayor sea el número de repeticiones CAG en el gen *Htt*, más temprano aparecen los síntomas. Entre el 4,4 y el 11,5% de los sujetos con la enfermedad tienen un inicio tardío (más de 60 años), lo que implica una lenta progresión benigna de la enfermedad (Chaganti *et al.*, 2017). En casos raros, cuando los síntomas comienzan antes de los 20 años, la enfermedad es denominada enfermedad de Huntington juvenil, y los sujetos presentan alteraciones del comportamiento, dificultades en el aprendizaje escolar y síntomas cerebelosos asociados con retraso motor, del habla y del lenguaje (Roos, 2010).

La *Htt* es una proteína que se encuentra en todos los tejidos humanos y de roedores, aunque es más abundante en el sistema nervioso central (SNC), donde se encuentra predominantemente en el citoplasma de las células cerebrales. Ha sido demostrado que la *Htt*, participa en el desarrollo del sistema nervioso, del transporte axonal y la supervivencia celular (Saudou & Humbert, 2016). La forma mutante de la Huntingtina (*mHtt*), que posee 40 o más repeticiones de CAG, forma fragmentos solubles y agregados que parecen ser tóxicos para neuronas, particularmente para las neuronas espinosas medianas en el cuerpo estriado, llegando posteriormente a otras áreas como la corteza cerebral, mientras que el cerebelo es una región donde generalmente no se observa el proceso neurodegenerativo (Silvestroni *et al.*, 2009). De hecho, se postula que estos agregados de *mHtt* pueden correlacionar con la progresión temprana de la enfermedad (Lee *et al.*, 2020). Aunque se han identificado varios mecanismos en la patología de la HD, cómo la *mHtt* causa la neurodegeneración sigue sin resolverse. Los

mecanismos patogénicos inducidos por *mHtt* son la disfunción en la reparación del ADN, modulación de la transcripción, disfunción proteasomal y de la autofagia, déficit en el transporte axonal e intracelular, disfunción mitocondrial y excitotoxicidad y todos ellos han sido implicados en el desarrollo de la HD.

En Argentina, la población control tiene un promedio de repeticiones muy similar a las poblaciones europeas (Gatto *et al.*, 2012) pero no hay datos de prevalencia de HD en nuestro país. En la actualidad no hay una cura disponible para HD, habiendo una sola droga aprobada por el *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de corea. Las terapias que intentan disminuir los niveles de *Htt* en pacientes con ensayos clínicos desarrollándose no logran discernir entre *Htt* y *mHtt* (Saudou & Humbert, 2016) y ensayos clínicos de fase 3 de un oligonucleótido *antisense* fueron abandonados ya que no produjo mejoría alguna en los pacientes respecto al placebo (Kwon, 2021). Como consecuencia el pronóstico para las personas afectadas por la enfermedad es muy desfavorable, por lo que la identificación de una nueva terapia tiene una gran importancia. Por lo tanto, consideramos que conocer nuevos mecanismos patogénicos de la neurodegeneración es fundamental para encontrar nuevos blancos terapéuticos para la HD.

1.2 Ácido 3-nitropropiónico

El ácido 3-nitropropiónico (3NP) es una toxina natural producida por hongos y plantas que actúa como un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa del complejo II mitocondrial (Ludolph *et al.*, 1991). Debido a que atraviesa la barrera hematoencefálica, la administración sistémica de 3NP produce una pérdida selectiva de neuronas estriatales y disfunción motora y cognitiva similar a la HD en roedores y primates no humanos (Brouillet *et al.*, 2005a). El tratamiento sistémico con 3NP induce niveles aumentados de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-6 e IL-1 β , en el cuerpo estriado de ratones (Abdelfattah *et al.*, 2020). Además, ratas tratadas con 3NP mostraron un aumento en la expresión de HMGB1 en el cuerpo estriado y en cultivo primario de neuronas estriatales (Qi *et al.*, 2015a). La disfunción mitocondrial inducida por 3NP genera altos niveles de especies reactivas del oxígeno y muerte celular en neuronas del estriado y astrocitos (Saba *et al.*, 2020). Por ende, 3NP es una herramienta útil para investigar los mecanismos de la patología de HD y sus efectos en las células gliales.

1.3 Microglía

La microglía es uno de los tipos celulares que se encuentran en el SNC. La microglía es considerada como los macrófagos del cerebro y representan entre un 5-12% del total de células cerebrales. Estas ayudan a la homeostasis cerebral realizando distintas tareas tales como vigilancia inmune, modulación de la neurogénesis y fagocitosis de microorganismos y de restos celulares o células dañadas, promoviendo la reparación del tejido dañado (Casano & Peri, 2015). También proporcionan un soporte trófico, modulan la plasticidad sináptica, contribuyen a la formación y maduración durante el desarrollo de los circuitos neuronales y neurogénesis en cerebros adultos (Kierdorf & Prinz, 2017). La microglía reactiva se puede caracterizar por cambios en la morfología celular, pasan de una morfología altamente ramificada a una con forma de ameboide y además inducen la producción de mediadores inflamatorios. La expresión de las proteínas CD11b y CX3CR1, las cuales son proteínas de membrana, son utilizadas como marcadores para la identificación de microglía (Jurga *et al.*, 2020).

La microglía se activa frente a un daño tisular o patógenos, esta activación induce la expresión y liberación de distintos mediadores pro-inflamatorios como quimiocinas y citoquinas. La expresión de *mHtt* en microglía induce la expresión de genes pro-inflamatorios lo que genera un efecto neurotóxico. La microglía de ratones HD exhibe un aumento en la expresión de PU.1, IL-6 y TNF- α y además induce un incremento en el número de neuronas apoptóticas en cultivo (Crotti *et al.*, 2014). Recientemente se reportó que la depleción de microglía en un modelo HD previene el déficit motor y cognitivo, reduce la astrogliosis y la pérdida de volumen estriatal (Crapser *et al.*, 2020). Todavía no se conoce bien cuál es la consecuencia de la activación de la microglía en HD. Teniendo en cuenta estos antecedentes el estudio de microglía HD puede aportar nuevos mecanismos protectores y patogénicos para la enfermedad.

1.4 Astrocitos

Los astrocitos son el tipo celular más abundante en el SNC. Estos participan en el mantenimiento de las funciones fisiológicas del cerebro, en la respuesta inflamatoria y en la formación de las sinapsis durante el desarrollo, además forman parte de la barrera hematoencefálica y regulan el flujo sanguíneo al SNC. La proteína GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*), la cual codifica para uno de los filamentos intermedios más

abundantes de estas células es utilizada como marcador para distinguir astrocitos de otras células gliales (Sofroniew & Vinters, 2010).

Tanto los pacientes HD como los modelos animales HD muestran disfunción de astrocitos y presencia de astrocitos reactivos que expresan altos niveles de GFAP (Khakh & Sofroniew, 2014). Al igual que la microglía los astrocitos se activan frente a un daño tisular o patógeno produciendo diferentes mediadores pro-inflamatorios. La neuroinflamación consecuencia de la activación sostenida en el tiempo de los astrocitos es considerada como uno de los principales componentes en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Por otra parte, los astrocitos también son capaces de liberar moléculas anti-inflamatorias, neurotróficas o antioxidantes (Sofroniew *et al.* 2015). Ratones transgénicos que expresan *mHtt* exclusivamente en astrocitos generan síntomas similares a los de la HD, como déficit motor después de un año, y estos ratones tienen mayor supervivencia (Bradford *et al.* 2009). Los astrocitos que expresan *mHtt* poseen una de sus funciones más importantes afectadas: la recaptación de glutamato, al exhibir menores niveles de expresión de los transportadores de este aminoácido, resultando en un aumento de la muerte neuronal por excitotoxicidad (Shin *et al.*, 2005).

Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio muestran un rol neuroprotector del medio condicionado de astrocitos de estriado normales sobre neuronas que expresan *mHtt* (Saba *et al.*, 2020). Mientras que astrocitos normales pueden ser protectores, astrocitos disfuncionales como se observan en HD podrían ser neurotóxicos. Por ende, los astrocitos son un blanco interesante para enfoques neuroprotectores en la HD.

1.5 HMGB1

High mobility group box 1 (HMGB1) es una proteína nuclear muy conservada que cumple diferentes funciones dependiendo donde se encuentre. En el núcleo, que es donde se encuentra mayoritariamente, estabiliza la cromatina, regula la transcripción y forma parte del proceso de reparación del ADN. HMGB1 se libera desde el núcleo hacia el citoplasma cuando la célula sufre necrosis (Faraco *et al.*, 2007). HMGB1 también puede ser liberada de forma pasiva al medio extracelular por neuronas frente a estímulos nocivos, y de forma activa desde astrocitos y microglía reactivos. En el medio extracelular, HMGB1 funciona como una alarmina ya que puede inducir inflamación a partir de la activación de sus receptores RAGE, TLR2 y TLR4 (Figura 1). En astrocitos, HMGB1 es liberada en respuesta a citoquinas (Hayakawa *et*

al., 2010). Poco se sabe sobre el rol de HMGB1 en HD. Ha sido reportado que la *mHtt* induce la liberación de HMGB1 desde el núcleo hacia el citoplasma y altos niveles de HMGB1 pueden aumentar levemente la agregación de *mHtt* (Min *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que se ha demostrado que HMGB1 puede desencadenar la activación de la glía y que se ha establecido su papel en la neurodegeneración (Faraco *et al.*, 2007), es posible que desempeñe un papel importante en la inflamación y la neurodegeneración en HD. En un cultivo primario de neuronas estriatales tratadas con 3NP, se observó un aumento en la expresión de HMGB1 (Qi *et al.*, 2015b). Se ha descrito que, durante la isquemia cerebral, HMGB1 se libera y desencadena la activación de la glía, lo que agrava la muerte neuronal causada por la isquemia (Faraco *et al.*, 2007). Es importante destacar que la reducción de los niveles cerebrales de HMGB1 mediante shRNA se correlaciona con una disminución en el volumen de infarto cerebral en ratas. (J. Bin Kim *et al.*, 2006). HMGB1 puede interactuar con distintos receptores como RAGE, TLR2 y TLR4 (Van Beijnum *et al.*, 2008). Poco se conoce sobre la acción de TLR2 y TLR4 en HD. TLR2 y TLR4 son receptores que activan la respuesta inmunitaria mediante la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. En las enfermedades neurodegenerativas, estos receptores contribuyen a la inflamación y al daño neuronal, que en parte está mediado por la liberación de HMGB1, que al unirse a TLR2 y TLR4 y desencadena una respuesta inflamatoria (Van Beijnum *et al.*, 2008). Entonces, la señal generada por la interacción HMGB1-receptor puede estar involucrada en neuroinflamación y neurodegeneración en HD. Por ende, HMGB1 y sus receptores son un blanco interesante para el estudio del desarrollo de HD.

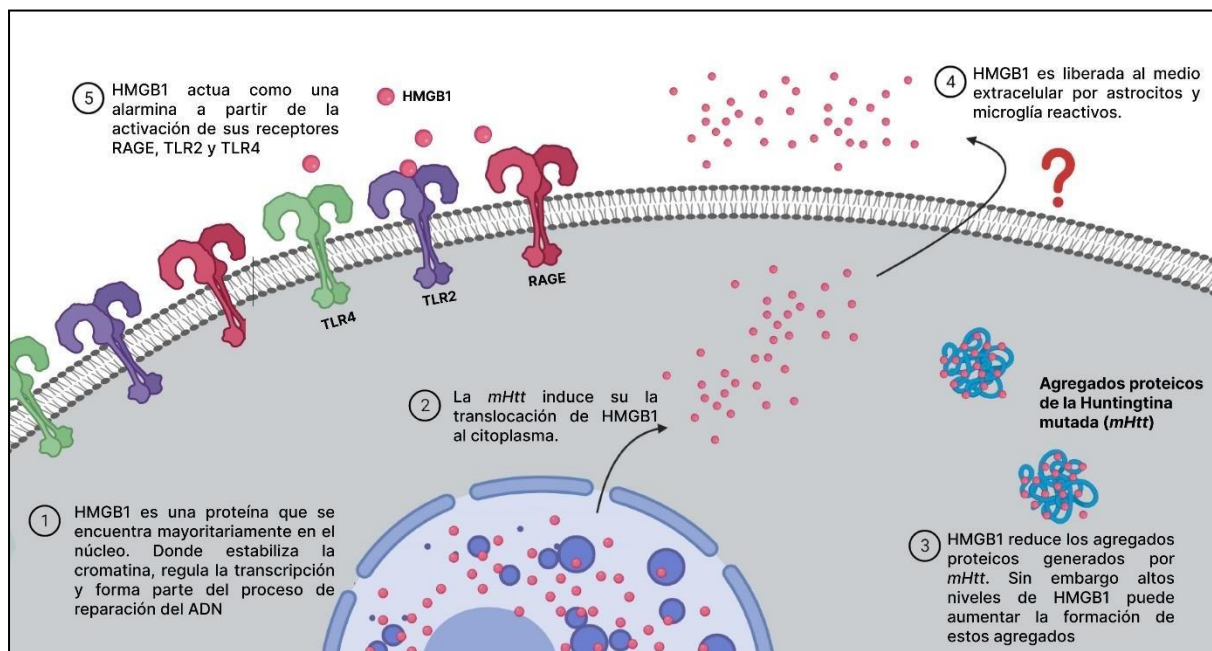


Figura 1. Mecanismo de acción de HMGB1 sobre células gliales que expresan *mHtt*.

1.6 C1q

C1q es una proteína del complemento formada por tres subunidades: C1qA, C1qB y C1qC. La vía clásica del complemento se activa cuando C1q se une al dominio Fc de los anticuerpos en complejos inmunes u otros activadores como células apoptóticas lo que promueve su degradación (Cho, 2019). C1q puede formar un complejo multimolecular con HMGB1 y RAGE en islas lipídicas y promover la diferenciación de monocitos a un fenotipo anti-inflamatorio (Son *et al.*, 2016). El ARNm de C1q aumenta en los cerebros de pacientes con HD (Singhrao *et al.*, 1999), lo que sugiere que C1q podría estar involucrado en la progresión de HD. La microglía HD secreta IL-1 α , C1q y TNF- α , que juntos activan a los astrocitos hacia un perfil neurotóxico (Liddelw *et al.*, 2017). Además, la eliminación de C1q por parte de la microglía en el cerebro de ratones mejora los trastornos cognitivos inducidos por la pérdida sináptica y la neuroinflamación (Markarian *et al.*, 2021). Aunque C1q puede ser liberado por células gliales, su papel en HD no se conoce. Ha sido descrito que HMGB1 puede interactuar con C1q y causar la activación de la vía clásica del complemento de forma independiente de anticuerpos y mediada por C1q (S. Y. Kim *et al.*, 2018). Por ende, es posible que HMGB1 junto con C1q puedan inducir la neuroinflamación conduciendo al deterioro neurodegenerativo en HD.

1.7 Toll-Like Receptors

TLRs son un grupo de receptores que en su mayoría se encuentran en la superficie celular. Reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y ligandos endógenos que son liberados por células estresadas o necróticas, llamados patrones moleculares asociados a daño. En enfermedades del SNC, los ligandos endógenos inducen la señalización de los TLRs como es el caso de HMGB1 (Sun *et al.*, 2017). Investigaciones indican que el perfil de expresión o liberación de citocinas y quimiocinas por los astrocitos depende del TLR involucrado y del ligando que se une a un TLR específico (Bsibsi *et al.*, 2007). Los estudios *in vitro* demostraron que la activación de TLR2 por α -sinucleína potencia la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL5 y CX3CL1, por los astrocitos. Mientras tanto, la inhibición de la activación de TLR2 astrocitaria mediante anticuerpos bloqueadores disminuye significativamente la respuesta proinflamatoria (Kim *et al.*, 2018).

1.8 Modelo de la enfermedad de Huntington

En este trabajo utilizaremos como modelo de HD el ratón transgénico Q175 con 180-200 CAG, que deriva de una expansión espontánea de CAG en el ratón *knock-in* Hdh 140. El ratón *knock-in* Q175 expresa el exón 1 de la *mHtt* humana reemplazando el exón 1 del gen de la *Htt* normal del ratón, así este modelo es más parecido a los pacientes HD que tienen un alelo normal y otro mutado (Menalled *et al.*, 2012a). Los ratones Q175 desarrollan síntomas como movimientos anormales, problemas de equilibrio y coordinación (Menalled *et al.*, 2012b).

1.9 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es determinar la expresión de HMGB1 y sus receptores en astrocitos y microglía provenientes del ratón Q175 un modelo de HD. Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Establecer el cultivo de astrocitos y microglía de corteza a partir de ratones WT y HD.
2. Evaluar la expresión de HMGB1 y su receptor TLR2 en cultivos de astrocitos y microglía proveniente de ratones WT y HD.

2. Antecedentes

Un estudio (Faraco *et al.*, 2007) donde Faraco y col. analizaron la activación glial causada por HMGB1 y demostraron que la exposición de células gliales a HMGB1 induce la liberación de mediadores pro-inflamatorias como iNOS, COX-2, IL-1 β y TNF- α (Figura 2).

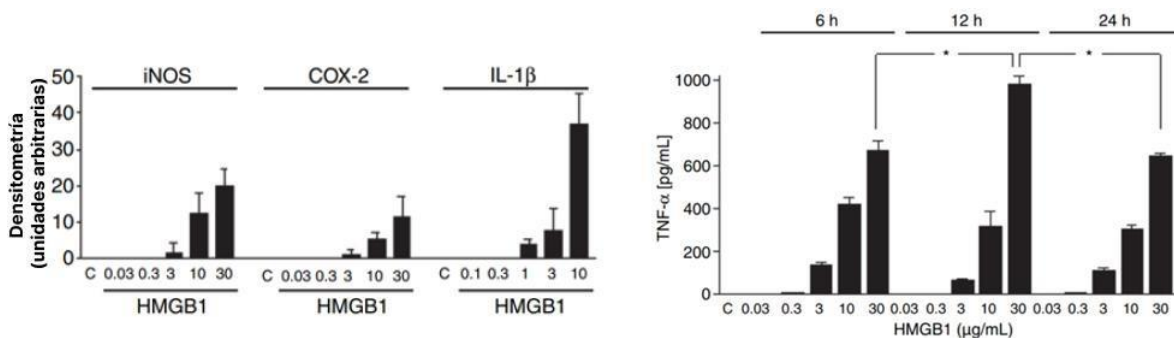


Figura 2. La exposición de las células gliales a HMGB1 indujo la expresión de iNOS, ciclooxigenasa (COX-2), interleucina (IL)-1 β y factor de necrosis tumoral (TNF) α en distintas concentraciones. (* $p < 0,05$) versus 6 y 24 h. Figura de (Faraco *et al.*, 2007). La imagen fue adaptada y traducida al español.

Dada la capacidad de HMGB1 para desencadenar la activación de la glía y el papel bien establecido de HMGB1 en la neurodegeneración (Faraco *et al.*, 2007), Faraco y col. estudiaron el potencial neurotóxico de HMGB1 recombinante *in vitro*. Expusieron una mezcla de células corticales conteniendo neuronas y glía a distintas concentraciones de HMGB1 y evaluaron la muerte celular por LDH liberado. Observaron que HMGB1 aumentó significativamente la muerte neuronal en cultivos expuestos a 30 $\mu\text{mol/L}$ glutamato y en los cultivos sometidos a privación de oxígeno y glucosa (Figura 3).

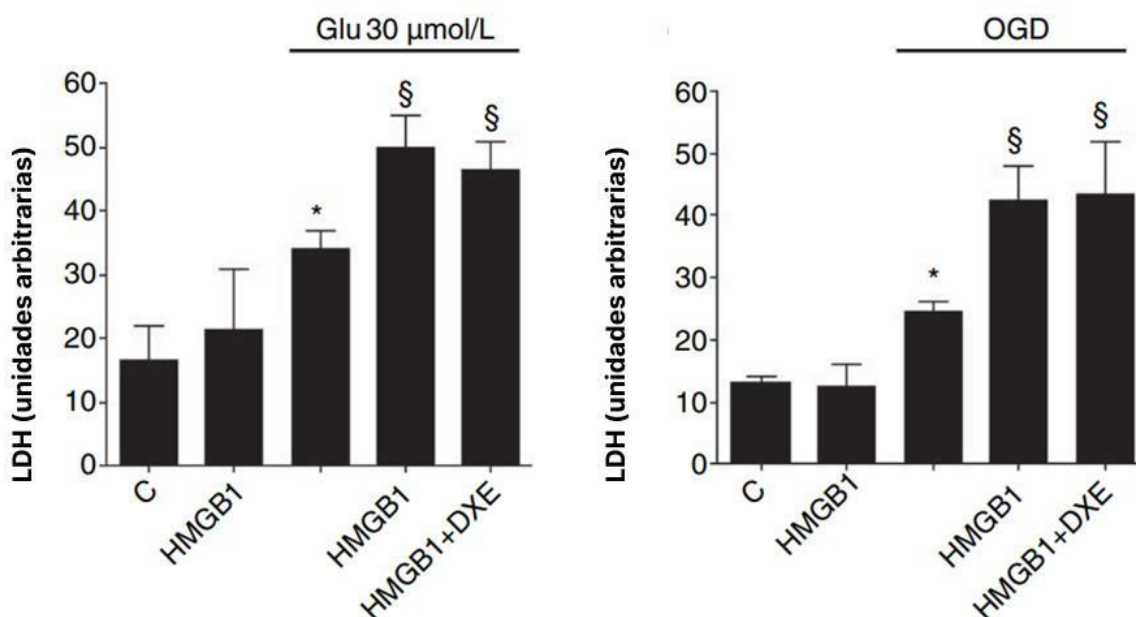


Figura 3. La mezcla de células fue expuesta a HMGB1, HMGB1 y Glutamato o HMGB1 más 30 minutos de privación de oxígeno y glucosa (OGD del inglés oxygen glucose deprivation). (* $p < 0,05$) versus control, (§ $p < 0,01$) versus control y (* $p < 0,05$) versus Glu o OGD. Figura de (Faraco et al., 2007). La imagen fue adaptada y traducida al español.

Por otro lado, Min y col. (Min et al., 2013) analizaron el rol que cumple HMGB1 como chaperona. Utilizó insulina y lisozima para evaluar el rol que cumple HMGB1 en la agregación de estas proteínas bajo un estrés químico. La agregación fue evaluada midiendo la turbidez in vitro y observó en ambos casos que HMGB1 redujo significativamente la formación de agregados.

Para investigar el efecto que HMGB1 tiene sobre los agregados de proteínas con polyQ expandido, transfectaron células con un plásmido de 97Q-GFP y se incubaron las células por 48 h en presencia o en ausencia de HMGB1. Observaron que el número de agregados proteicos se redujo significativamente en las células que fueron co-transfectadas con el plásmido de HMGB1 de manera dosis dependiente (Figura 4). Por otro lado, también observaron un leve incremento en el número de agregados cuando la concentración de HMGB1 era de 8 µg/mL.

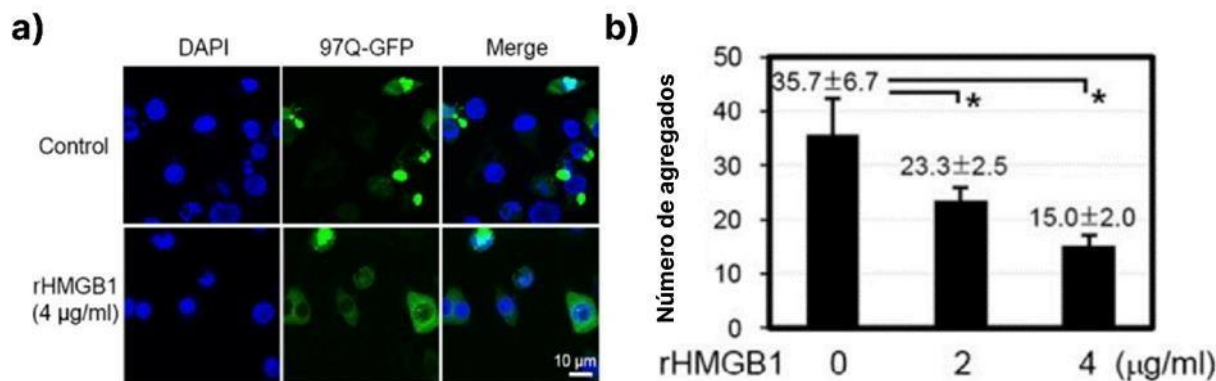


Figura 4. Efecto de la proteína rHMGB1 en la formación de agregados de 97Q-GFP. Las células SHSY5Y fueron transfectadas con el plásmido 97Q-GFP (verde) y luego tratadas con rHMGB1 a distintas concentraciones. (A) Se observó una reducción en el número de agregados en el grupo tratado con rHMGB1 respecto al control. (B) El número de células conteniendo agregados fue contado entre 100 células GFP-positivas y hubo una reducción en el grupo tratado con rHMGB1 (* $p < 0.05$) versus grupo no tratado con rHMGB1. Figura de (Mín et al., 2013). La imagen fue adaptada y traducida al español.

Finalmente, Mín y col. evaluaron el efecto de HMGB1 sobre la citotoxicidad inducida por 97Q-GFP. Las células de SHSY5Y fueron co-transfectadas con los plásmidos 97Q-GFP y HMGB1 por 48 h y luego determinaron la muerte celular como la cantidad de células positivas con la tinción de azul tripán (Figura 5). Vieron un aumento de la viabilidad celular/disminución del número de células muertas en presencia del plásmido de HMGB1. Esto sugiere que el efecto de HMGB1 sobre la viabilidad neuronal podría depender del contexto ya que puede ser dañino (Figura 3) o beneficioso (Figura 4).

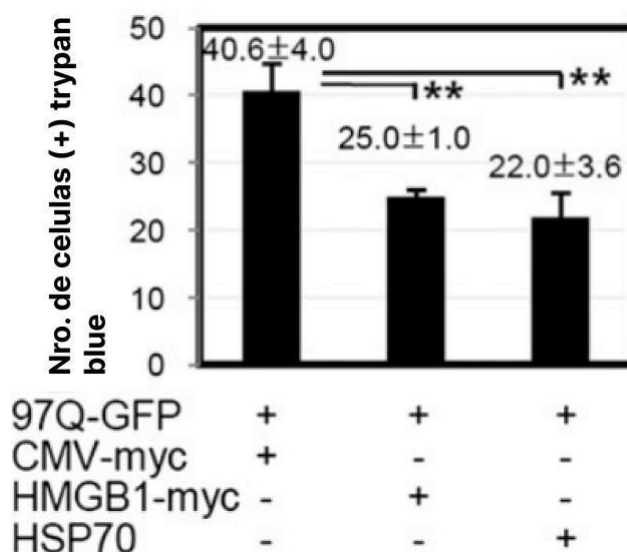


Figura 5. Efecto de HMGB1 en la citotoxicidad inducida por 97Q-GFP. Se utilizó el plásmido únicamente con GFP como control negativo y HSP70 como control positivo. El número de células teñidas con azul tripán disminuyó significativamente en presencia de HMGB1. Figura de (Min et al., 2013). La imagen fue adaptada y traducida al español.

En nuestro laboratorio se realizó un estudio en células ST14A, una línea celular de neuronas estriatales de rata que fue modificada por la inserción de un fragmento del exón 1 de la proteína *mHtt* humana (Q120) o de un fragmento del exón 1 de la proteína *Htt* humana (Q15). En ese estudio analizamos la expresión de HMGB1 en las células ST14A y encontramos un aumento en la fluorescencia nuclear de HMGB1 en células Q120 en comparación con células Q15 (Figura 6).

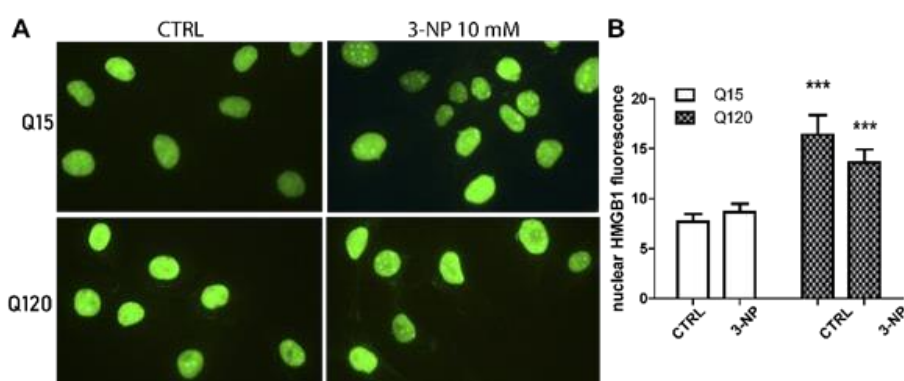


Figura 6. Expresión de HMGB1 en células estriatales ST14A. (A) Las células ST14A-Htt Q15 (Q15) o ST14A-Htt Q120 (Q120) fueron tratadas por 24 h con 3NP 10 mM. Se evaluó la expresión de HMGB1 por inmunocitoquímica. (B) Cuantificación de la fluorescencia de 3 experimentos independientes. ***p<0,001 versus Q15.

Además, realizamos un análisis bioinformático (Figura 7) que indica que el ARNm de HMGB1 aumenta en cerebros de ratones R6/2, otro ratón modelo de HD y en sangre de pacientes HD (Motion *et al.*, 2005) y en un reciente trabajo se observó un análisis de la expresión de exones de la sangre de pacientes HD donde también aumentan los niveles de ARNm de HMGB1 (Andrade-Navarro *et al.*, 2020).

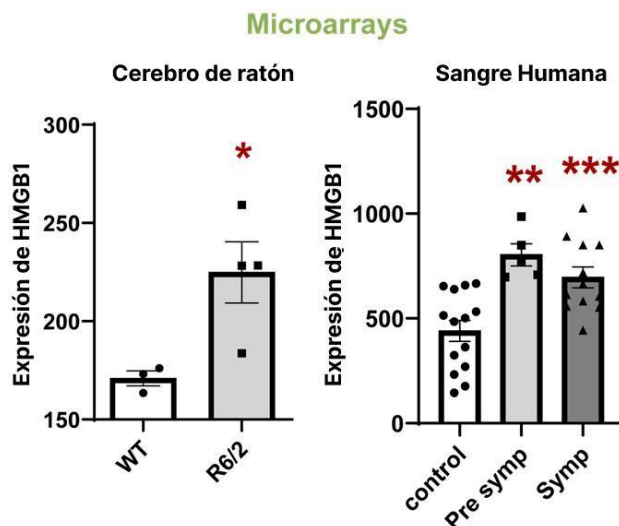


Figura 7. La expresión de HMGB1 (ARNm) aumenta en cerebros de ratones R6/2 y en sangre de pacientes HD. Microarrays del ratón R6/2 y de sangre humana se utilizaron para realizar un análisis bioinformático utilizando el programa ScanGeo. * $p < 0.05$ versus WT, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ versus control

3. Hipótesis

Dado que en pacientes HD aumentan los niveles plasmáticos de IL-6 y TNF-alfa, y el ARNm de HGMB1 en sangre, y que neuronas del estriado de rata que expresan *mHtt* tienen mayores niveles de HMGB1 nuclear, esperamos que los niveles de HMGB1 estén aumentados en cerebros HD. Por lo que es probable que neuronas y/o astrocitos y/o microglía HD aumenten la expresión y/o secreción de HMGB1 generando inflamación. Es posible, que el aumento de HMGB1 esté acompañado de un aumento de C1q y ambas proteínas estén involucradas en la inflamación de HD. Quizás, la expresión de TLR2, uno de los receptores de HMGB1, también se encuentre aumentada ayudando al proceso inflamatorio en HD.

4. Metodología

4.1 Materiales

El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés Dulbecco's modified Eagle's medium), DMEM, así como los suplementos, antibióticos y tripsina fueron adquiridos en ThermoFisher Scientific (Buenos Aires, Argentina). El 3NP fue adquirido en Sigma-Aldrich-Merck (Buenos Aires, Argentina). El suero fetal bobino (SFB) fue adquirido en Natocor (Córdoba, Argentina). Los anticuerpos anti-TLR2, anti-ALDH1L1 son de Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos). Los anticuerpos anti-GFAP, anti-CX3CR1, anti-C1qA fueron adquiridos en NovusBio (Colorado, Estados Unidos). El Anticuerpo Anti-HMGB1 fue adquirido en Abcam y los anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado con Alexa Flúor 488 y el anti-conejo conjugado con Cy3 fueron de Jackson ImmunoResearch (Pensilvania, Estados Unidos). También se utilizó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC de Vector Laboratories.

4.2 Animales

Los ratones Q175 con 180-200 CAG fueron adquiridos en Jackson Laboratories (Catálogo 027410) y son mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED) a temperatura controlada de 25°C y con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con acceso a alimento (*lab chow*) y agua *ad libitum*. Son criados en jaulas de metal o policarbonato con un macho y una hembra por jaula para los apareos y hasta 5 ratones por jaula del mismo sexo para el *stock*. El uso de animales de laboratorio, así como los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

4.3 Genotipificación

Previo al cultivo primario se evalúa el genotipo de los animales para identificar los ratones con el transgén de *mHtt*. Se extrajeron muestras de tejido proveniente de colas obtenidas de ratones de 1-7 días de vida y se colocaron dentro de un eppendorf. Para la extracción de ADN se agregaron 50 µL de buffer de lisis (NaOH 25 mM) a cada tubo y los tubos fueron colocados en un ciclador (Ivema) donde estuvieron 1 hora a 96°C y cada 20 minutos se los mezclaba con un vortex. Luego de la hora se dejaron enfriar las muestras y se les agregaron 50

μL de buffer de neutralización (Tris-HCL 40 mM). Luego se midió la concentración de ADN en un NanoDrop (ThermoScientific). Después se preparó la *Master Mix* para realizar la PCR, la cual contiene los *primers forward* y *reverse* para *Htt* y los *primers forward* y *reverse* para la neomicina presente en el cassette insertado en el exón 1 de la *mHtt* (ver Tabla I). A cada muestra se agregaron, 5 μL de Mix, 0,22 μL de cada *primer Htt forward* y *reverse*, 0,22 μL de cada *primer Neomicina forward* y *reverse*, 1 μL de *enhancer* y 3,1 μL de agua libre de DNAsa. Se los llevó al termociclador donde se realizó la PCR por 40 ciclos siguiendo un protocolo estándar 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 5 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos y 60°C durante 60 segundos. Una vez finalizada la PCR se prepararon las muestras para ser sembradas en un gel de 3% agarosa. Se les agregó 3 μL de *loading buffer* a cada muestra, al blanco y a 2 μL de *ladder* de 50 pb. Finalmente se largó la corrida en el gel por 1 hora a 80 volts y después se sumergió el gel en una solución con 1 μg/mL de bromuro de etidio y se dejó en agitación por 10 minutos. Luego se pasó el gel a un contenedor con agua para lavarlo, se revelaron las bandas con luz UV y se sacó una fotografía del gel en el programa informático ImageQuant300 (GE HealthCare).

Hdh1	CATTCATTGCCTTGCTGCTAAG
Hdh2	CTGAAACGACTTGAGCGACTC
Neo1	GATCGGCCATTGAACAAGATG
Neo2	AGAGCAGCCGATTGTCTGTTG

Tabla I. Primers utilizados para la PCR. Hdh del inglés (*Huntington's Disease Gene Homolog*) amplifica el gen de la Htt. Neo amplifica el gen de neomicina.

4.4 Cultivos primarios de astrocitos y microglía

Los cultivos primarios gliales se realizaron a partir de ratones Q175 de 1 a 7 días de edad. Los genotipos de las crías se determinaron como se describió en el punto 4.2. Los astrocitos y microglía fueron preparados siguiendo el método descrito por (Rodríguez *et al.*, 2017), modificado para separar astrocitos y microglía de corteza y de estriado. Los hemisferios cerebrales fueron disecados y la corteza se separó de las demás regiones. El tejido fue cortado en pequeños pedazos con bisturí en una placa de Petri donde se agregó por cada cerebro utilizado 0,5 mL de Tripsina-EDTA (0.25%)-EDTA (1mM) en HBSS 1X para corteza en el

caso de estriado se agregó 0,25 mL de Tripsina-EDTA por cerebro. Luego, de la disgregación mecánica se lavó la placa de Petri de corteza únicamente con el mismo volumen de Tripsina-EDTA que se usó en el paso anterior para corteza, en el caso de estriado no se agregó más Tripsina-EDTA y con una pipeta Pasteur se trasvasó a un Falcón de 50 mL estéril. Se realizaron 10 disgregaciones mecánicas con la pipeta y la suspensión celular se colocó sobre un agitador orbital durante 20 minutos a 100 rpm y 37°C. Una vez pasados los 20 minutos se agregó el doble de volumen de medio completo en el tubo (DMEM + 10% SFB + L-glutamina 100 mM 1:100 + Piruvato de Sodio 100 mM 1:100 + St-Pen 100 mM 1:200) para frenar la actividad de la tripsina y se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm. Se descartó el sobrenadante con pipeta y las células se lavaron en 10 mL de medio solo (DMEM) y se volvieron a centrifugar por 10 minutos a 2000 rpm. Se descartó el sobrenadante con pipeta y las células se resuspendieron en 10 mL de medio completo. Luego se incubaron los 10 mL de suspensión celular por 60 minutos a 37°C en una estufa con 5% de CO₂ en una placa de Petri de 100 mm preincubada con gelatina 2% por 15 minutos. Finalmente, la suspensión celular de la placa de Petri fue transferida a un tubo y se diluyó con 10 mL de medio completo por cada 2-3 cerebros utilizados y 10 mL fueron transferidos a botellas preincubadas con 2% de gelatina por 15 minutos. Las células adheridas a la placa fueron descartadas. Al día siguiente y cada tres días se cambió el medio de las botellas por medio completo fresco. Luego de 14-21 días una vez formada la monocapa de astrocitos, el cultivo se agitó por 2 horas a 180 rpm y 37°C para separar la microglía. Se recolectó el sobrenadante en un tubo de 50 mL y se centrifugó de 5-7 min a 2000 rpm. Se resuspendió en 1 mL de medio completo y se contó el número de células que no se tiñeron con azul de tripán en una cámara de Neubauer. La microglía se sembró en cubreobjetos de 12 mm (Marienfeld) en una concentración aproximada de 20000 células/well. Los astrocitos se agitaron 2-3 veces overnight a 180 rpm a 33°C para separar el resto de las células gliales pegadas a la monocapa de astrocitos. Luego de la última agitación, se descartó el sobrenadante y se lavaron los astrocitos con Tripsina (10X) y se incubaron por 5 minutos a 37°C y se agregó medio completo para inactivar la tripsina y levantar las células que luego se transfirieron a un tubo de 50 mL y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante con pipeta y se resuspendió el pellet de células en 3 mL de medio completo. Los astrocitos fueron sembrados en placas de 24 wells y de 6 wells. A cada well de la placa de 24 se les agregó un vidrio que fue tratado con gelatina 2% por 15 minutos, sobre los cuales se sembraron 20000 células por vidrio para realizar inmunocitoquímica. En la placa de 6 wells pretratada con gelatina 2% por 15 minutos se

sembraron 600000 células por well para realizar extracción de proteínas totales para *Western Blot*. Para el tratamiento con 3NP en astrocitos incubamos a las células WT y HD por 24 h en 3 mL de medio sin SFB con 3NP 15 mM y el otro grupo se incubaron las células por 24 h en medio sin SFB. Para microglía se utilizó el mismo protocolo solo que se utilizó de 3NP 5 mM.

4.5 Caracterización de las poblaciones de astrocitos

Para caracterizar los cultivos de astrocitos, se evaluó la marcación de GFAP de astrocitos de corteza por inmunocitoquímica. Las células fueron lavadas con *buffer* fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) y fijadas con PBS-paraformaldehído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron en PBS-Tritón X-100 al 0,1% por 10 minutos a temperatura ambiente y luego fueron incubadas en solución de bloqueo formada por PBS-TX 0,1% y 10% de suero de cabra por una hora a temperatura ambiente. Luego de esto, se incubaron con el anticuerpo primario anti-GFAP (dilución 1:3000) en *buffer* de dilución conteniendo 1% de suero de cabra en PBS-TX 0,1% durante toda la noche a 4°C. Después de ser lavadas en PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Cy3 hecho en cabra con una dilución 1:800 en *buffer* de dilución conteniendo PBS-TX 0,1% y 1% suero de cabra por una 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se montaron en el portaobjetos sobre 4 µL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El control de unión inespecífica se realizó incubando a las células con *buffer* de dilución en lugar del anticuerpo primario. Las imágenes fueron tomadas utilizando un objetivo 40x de un microscopio de fluorescencia Axiophot (Carl Zeiss). Se determinó el número de células GFAP -positivas en cada cultivo. Además, se procesaron las imágenes utilizando el programa ImageJ para obtener la intensidad de fluorescencia de GFAP y la misma fue corregida por el número de células por imagen.

4.6 Caracterización de las poblaciones de microglía

Para caracterizar los cultivos de microglía, se evaluó la expresión de los marcadores CD11b/CX3CR1 en microglía de corteza por inmunocitoquímica. Las células se sembraron sobre vidrios en placas de 24 pocillos. Luego, de 24 h de incubación en medio completo o luego de 24 h de incubación con y sin 3NP en medio sin suero, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con PBS-paraformaldehído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron en PBS-TX al 0,1% por 10 minutos a temperatura ambiente y luego fueron

incubadas en solución de bloqueo formada por PBS-TX 0,1% y 10% suero de cabra por una hora a temperatura ambiente. Luego para la marcación de CD11b, se bloqueó con el anticuerpo Fab hecho en mouse (dilución 1:3000) durante una hora. Después, se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD11b (dilución 1:100) en buffer de dilución conteniendo 1% suero de cabra en PBS-TX 0,1% durante toda la noche a 4°C. Después de ser lavadas en PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 488 hecho en cabra con una dilución 1:800 en buffer de dilución conteniendo PBS-TX 0,1% y 1% suero de cabra por una hora a temperatura ambiente. Para caracterizar la microglía con CX3CR1 las células fueron lavadas con PBS y fijadas con PBS-paraformaldehído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron en PBS-TX al 0,1% por 10 minutos a temperatura ambiente y luego fueron incubadas en solución de bloqueo formada por PBS-TX 0,1% y 10% suero de cabra por una hora a temperatura ambiente. Luego, se incubaron con el anticuerpo primario anti-CX3CR1 (dilución 1:300) en buffer de dilución conteniendo 1% suero de cabra en PBS-TX 0,1% durante toda la noche a 4°C. Después de ser lavadas en PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo FITC hecho en cabra con una dilución 1:800 en buffer de dilución conteniendo PBS-TX 0,1% y 1% suero de cabra por una hora a temperatura ambiente. Los vidrios tanto de CD11b/CX3CR1 se lavaron y se montaron en el portaobjetos sobre 4 µL de DAPI. El control de unión inespecífica se realizó incubando a las células con buffer de dilución en lugar del anticuerpo primario. Las imágenes fueron tomadas utilizando un objetivo 40x de un microscopio de fluorescencia Axiophot (Carl Zeiss). Se determinó el número de células CX3CR1-positivas y CD11b-positivas en el cultivo. Además, se procesaron las imágenes utilizando el programa ImageJ para obtener la intensidad de fluorescencia de CD11b/CX3CR1 que fue corregida por el número de células por imagen.

4.7 Extracto de proteínas totales

La extracción de proteínas se realizó a partir de un cultivo de astrocitos en un multiwell de 6. Primero se descartó el medio de cultivo y se lavó cada well con 1,5 mL de PBS. Después se agregaron 200 µL de tripsina-EDTA (GIBCO) a cada well y se incubó la placa a 37°C por 3 minutos. Luego, se inactivó la tripsina agregando 1 mL de medio de cultivo completo conteniendo 10% de SFB. Las células se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Después, se agregó al pellet 50 µL de buffer de lisis RIPA (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, SDS 0,1%, IGEPAL 1%, EDTA 1 mM y Na deoxycholate 0,1%) con inhibidores

(2mM PMSF, 10 mM NaF, 1mM Na₃VO₄ y 1:100 de Cocktail de inhibidores de proteasas Sigma) y se dejó incubar 10 min a 4°C, luego de lo cual se sonicó por 5 segundos y se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4°C. Finalmente se pasó el sobrenadante correspondiente al extracto de proteínas totales a otro eppendorf, descartando el pellet, y luego de tomar una alícuota para medir proteínas por Bradford se guardó a -70°C.

4.8 Western Blot

Del extracto de proteínas totales 30-50 µg de proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) utilizando un gel 12%. La corrida electroforética fue realizada en un buffer conteniendo Tris-Base (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,12%), con un pH 8,6 a 400 mA durante 30 minutos y después a 200V durante 30 minutos. Luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno durante 1 hora a 150 mV en buffer de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) a 4°C en cámara fría. Para verificar la corrida electroforética se tiñeron los geles con azul de Coomassie. La tinción de rojo Ponceau se realizó para verificar la presencia de proteínas en las membranas de fluoruro de polivinilideno. Las membranas fueron bloqueadas por 1 hora con buffer tris salino (TBS, del inglés tris-buffered saline)- Tween 20 0,1% y 3% leche descremada. Las membranas se incubaron con anti-HMGB1 con una dilución 1:30000 o anti- α -tubulina con una dilución 1:5000 y con 3% leche descremada a 4 °C durante toda la noche. Luego de lavar con TBS-Tween 20 0,1%, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo correspondiente conjugado a HRP anti-conejo-HRP (Abcam) con una dilución 1:3000 rabbit en TBS-Tween 20 0,1% y 3% leche descremada en ambos casos (HMGB1 Y α -tubulina) durante 1 hora a temperatura ambiente. La presencia de las proteínas se reveló utilizando Bio-Lumina, un kit de quimioluminiscencia de PB-L Productos Bio-Lógicos (Buenos Aires, Argentina). Se compararon los niveles de expresión entre WT y HD utilizando α -tubulina como control de carga. La intensidad de las bandas fue determinada con ImageJ.

4.9 Análisis estadístico

El programa informático GraphPad Prism fue utilizado para realizar el análisis estadístico de los datos experimentales. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar (ES). La diferencia entre las medias fue determinada de acuerdo con cada experimento.

Se realizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni para los datos correspondientes a la inmunocitoquímica entre los grupos control y 3NP. Se realizó el *test t* de *Student* para los datos correspondientes a la inmunocitoquímica comparando los grupos WT y HD y el *test t* de una muestra para los datos correspondientes a *Western Blot*. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de “p” fue menor a 0,05.

5. Resultados

5.1 Puesta a punto de cultivos primarios de astrocitos y microglía

Para obtener el cultivo primario de astrocitos y microglía, se utilizó el protocolo del laboratorio que se empleaba para el cultivo primario de células gliales proveniente de cerebros de ratas (Saba *et al.*, 2020). Sin embargo, el rendimiento del cultivo primario en ratones con este protocolo no fue satisfactorio, por lo que se optó por utilizar otro protocolo de cultivo para células gliales de ratón (Rodríguez *et al.*, 2017). Debido a que cruzamos ratones WT con ratones HD previo a los cultivos se realiza la genotipificación para identificar las crías WT de las HD (Figura 8).

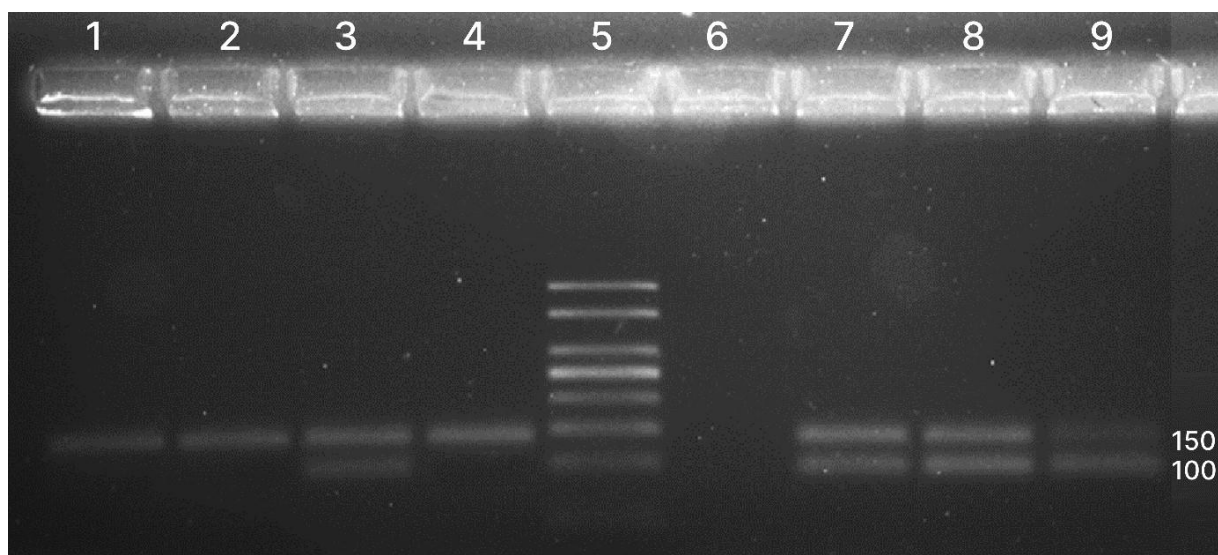


Figura 8. Genotipificación de ratones por PCR. Calles 1, 2 y 4 presentan una sola banda para *Htt* WT indicando que las crías son WT. Calles 3, 7, 8 y 9 presentan dos bandas. La primera banda de 150 pb para la *Htt* WT y la segunda banda de 100 pb para la *Htt* mutada caracterizando a las crías con *Htt* mutada. La calle 5 es el *ladder* de 50 pares de bases y la calle 6 es un blanco sin ADN el cual no presenta amplificación validando la reacción de PCR.

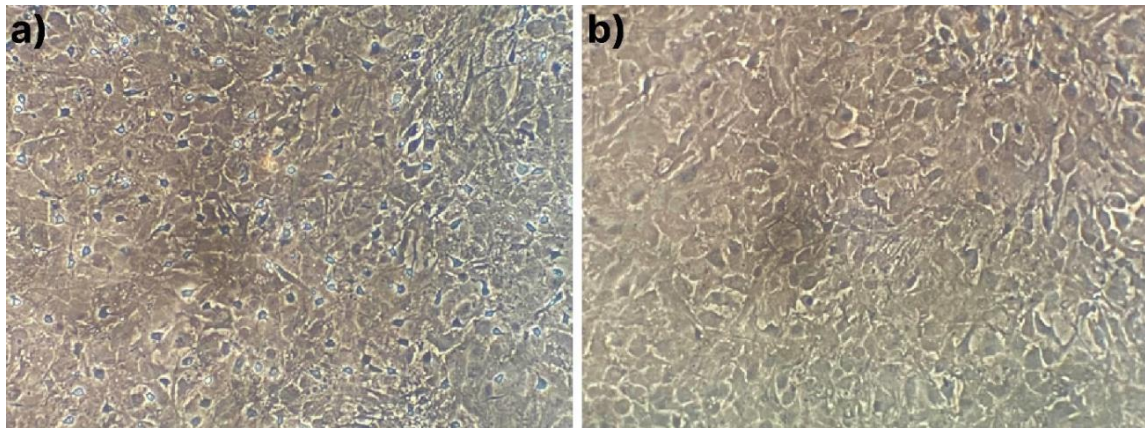


Figura 9. (A) Imagen del cultivo primario de astrocitos de corteza de ratón WT. (B) Imagen del cultivo primario de astrocitos de estriado de ratón WT.

Los cultivos primarios de astrocitos de corteza y de estriado WT con el nuevo protocolo crecieron de manera óptima (Figura 9). Los resultados que mostramos en este trabajo corresponden a los cultivos de astrocitos de corteza que alcanzaron un porcentaje de pureza del 93% (Figura 10A). La pureza se determinó por inmunocitoquímica de la proteína GFAP, la cual codifica para uno de los filamentos intermedios más abundantes de estas células, y es utilizada como marcador para astrocitos (Sofroniew & Vinters, 2010). Mientras que en los cultivos primarios de microglía de corteza se obtuvo un porcentaje de pureza de un 98% (Figura 10B). La pureza se determinó a través de inmunocitoquímica de la proteína CX3CR1 comúnmente usada para marcar microglía.

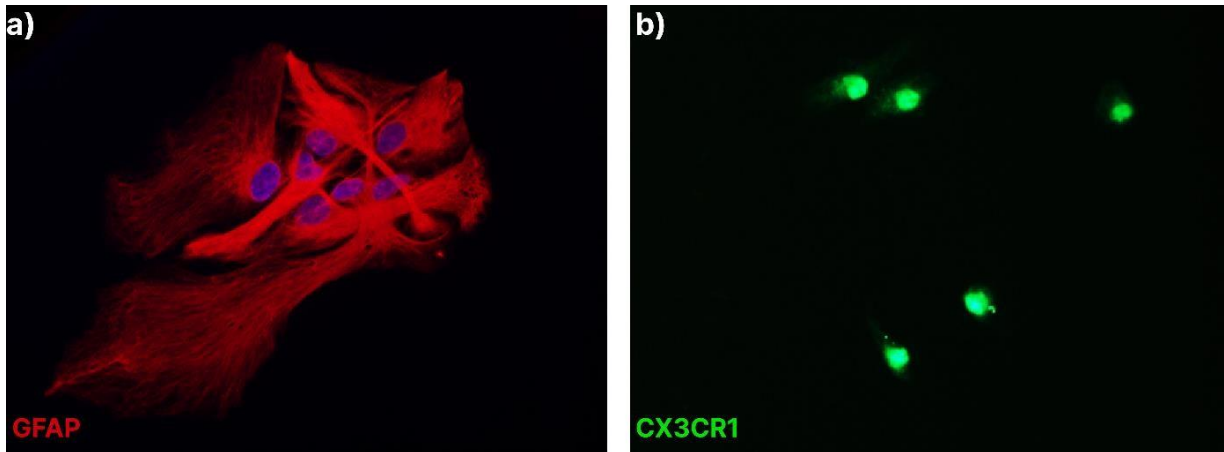


Figura 10. Caracterización de cultivos primarios de células gliales (A) Inmunocitoquímica de cultivos primarios de astrocitos de corteza de ratón con los marcadores para GFAP (rojo) y núcleos tenidos con DAPI (azul). (B) Inmunocitoquímica de cultivos primarios de microglía de corteza de ratón con los marcadores para CX3CR1 (Verde).

5.2 Inmunocitoquímica de astrocitos y microglía

Una vez puesto a punto el cultivo de ratón de células gliales, se investigó la expresión de HMGB1 y sus receptores en astrocitos y microglía en un modelo de HD. Realizamos cultivos de astrocitos y microglía de corteza de ratones WT y HD. Primero analizamos la expresión de CD11b y CX3CR1 para microglía y GFAP para astrocitos y no se observaron diferencias significativas entre los grupos WT y HD (Figura 11).

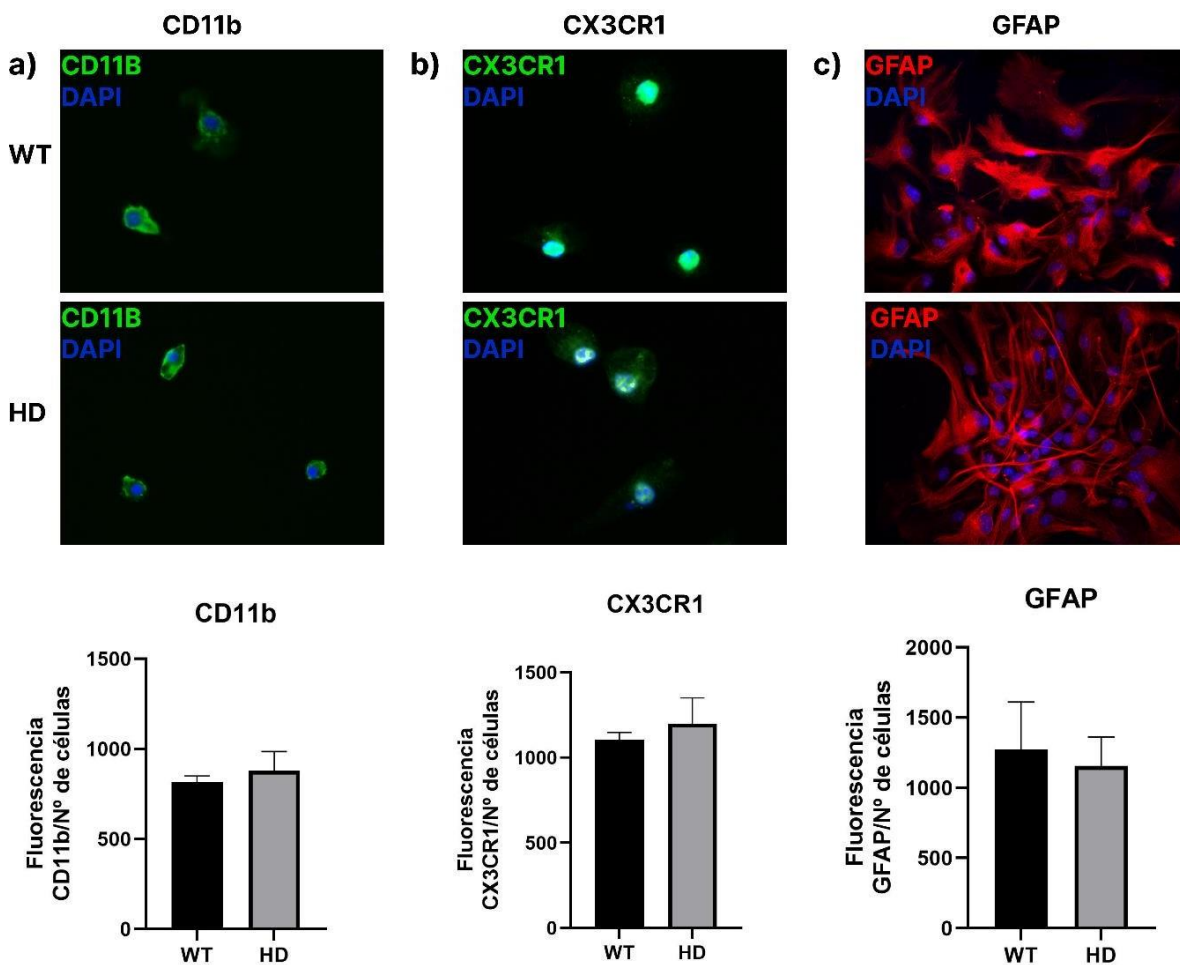


Figura 11. Expresión de CD11b, CX3CR1 y GFAP. Inmunocitoquímica de CD11b (A) y CX3CR1 (B) en microglía de corteza. (C) Inmunocitoquímica de GFAP en astrocitos de corteza. Se muestra la media + ES de fluorescencia de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados por el *test t* de Student.

5.3 Astrocitos

Los cultivos de astrocitos WT y HD fueron crecidos en 10% SFB y sin tratamientos y en esas células evaluamos la expresión de HMGB1 y TLR2. No encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de HMGB1 y TLR2 en astrocitos de corteza WT y HD (Figura 12).

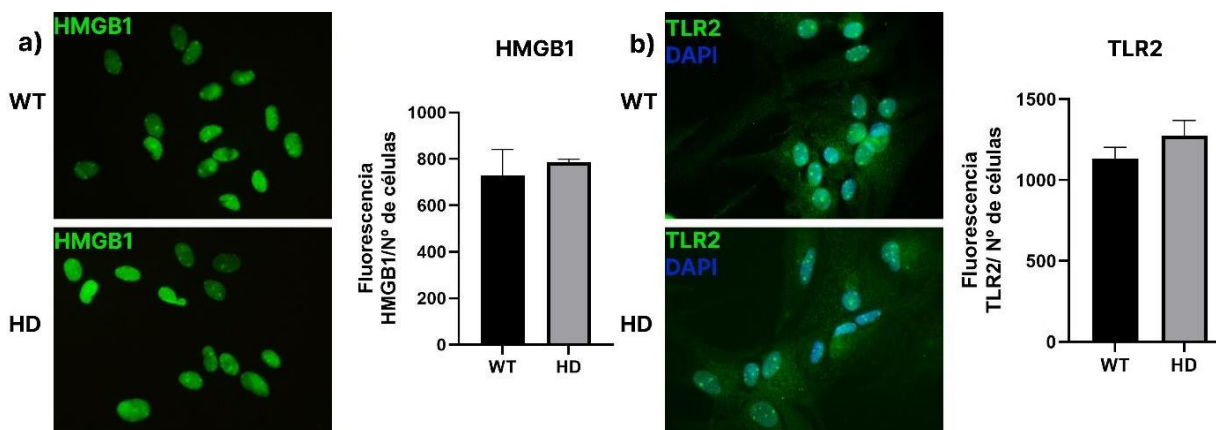


Figura 12. Expresión de HMGB1 Y TLR2. Inmunocitoquímica de HMGB1 (A) y de TLR2 (B) en astrocitos de corteza. Se muestra la media + ES de fluorescencia de 4 experimentos independientes. Los datos fueron analizados por el *test t* de Student.

En ratones el tratamiento sistémico con 3NP induce muerte neuronal del estriado (Brouillet *et al.*, 2005b), niveles aumentados de citocinas proinflamatorias en el cuerpo estriado (Abdelfattah *et al.*, 2020) y causa disfunción mitocondrial (Brouillet *et al.*, 2005a). Para generar condiciones más similares a las que se encuentran en HD, generamos disfunción mitocondrial con el 3NP. En este caso incubamos a los astrocitos WT y HD en medio sin SFB con 3NP para el grupo tratado (3NP) mientras que en el grupo sin tratar se incubaron las células por 24 h en medio sin SFB (control). Evaluamos el efecto del 3NP en la expresión de HMGB1 y TLR2 de astrocitos de corteza WT y HD. La expresión de HMGB1 aumentó significativamente en el grupo HD control en comparación con el WT control, mientras que el 3NP no modificó la expresión de HMGB1 en astrocitos WT o HD, aunque el grupo WT 3NP muestra una tendencia al aumento respecto al WT C (Figura 13). La expresión de TLR2 no cambio en ninguno de los grupos independientemente del tratamiento, aunque el grupo HD 3NP muestra una tendencia al aumento respecto al WT 3NP (Figura 14). Dado que HMGB1 está elevado en astrocitos HD, evaluamos la expresión de C1q, la proteína del complemento que puede interactuar con HMGB1. Se realizó la inmunocitoquímica para C1qA, que forma C1q, en astrocitos para evaluar su expresión, sin embargo, se observó que esta proteína no se expresa en los astrocitos de la corteza.

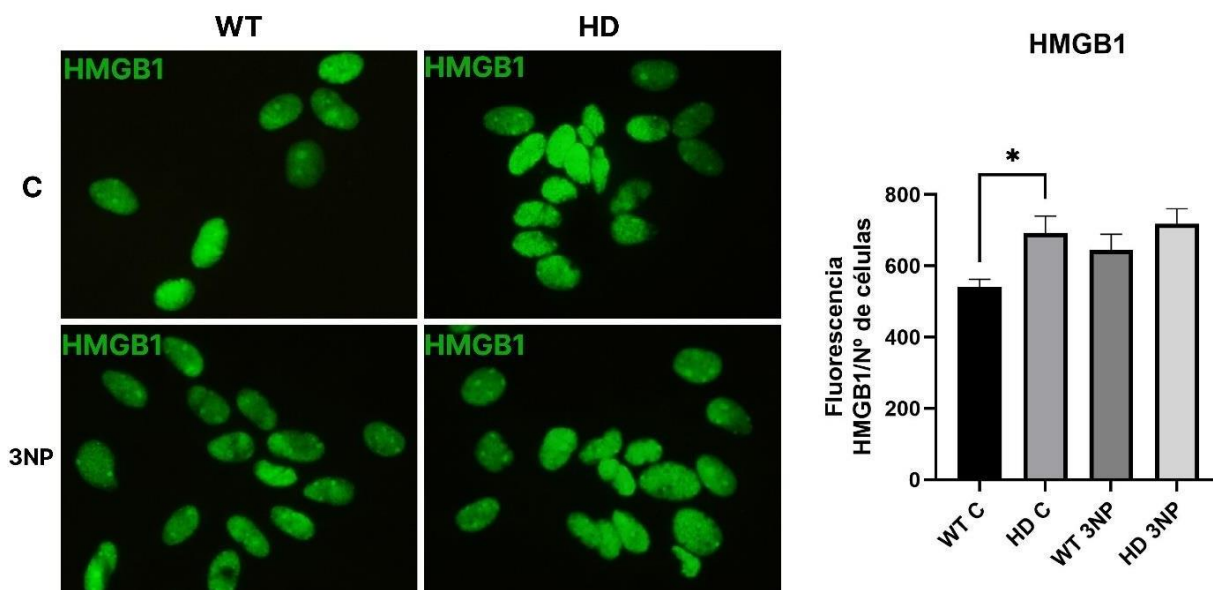


Figura 13. Expresión de HMGB1 en astrocitos de corteza WT y HD. Inmunocitoquímica de HMGB1 en astrocitos de corteza WT y HD control (C) y tratados con 3NP 15 mM por 24 h (3NP). Se muestra la media + ES de fluorescencia de 4 experimentos independientes. Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$ vs. WT C).

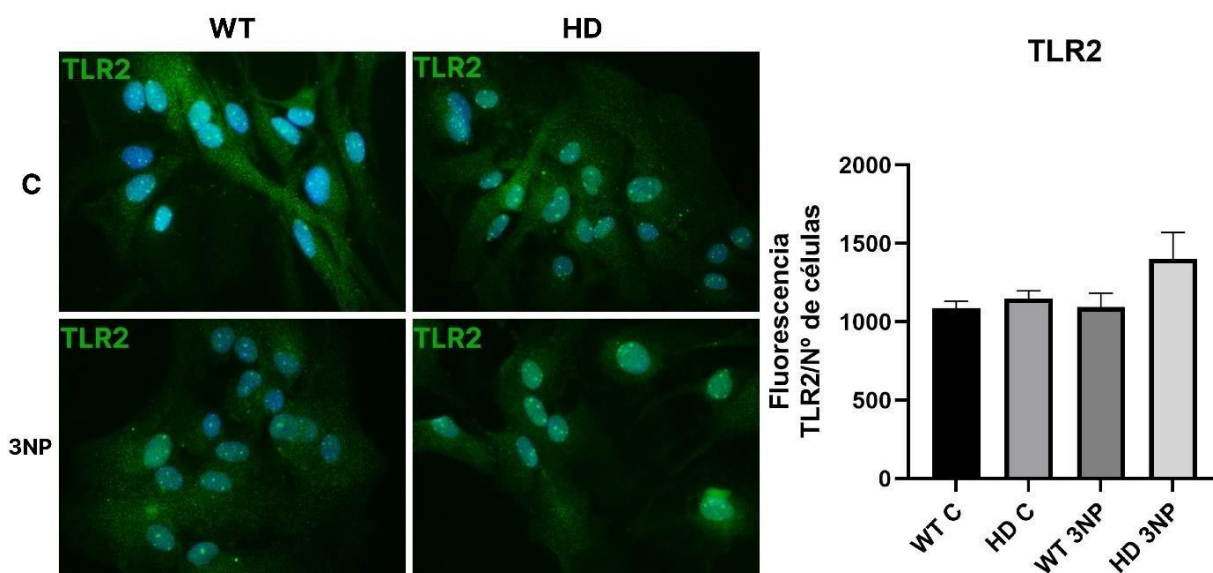


Figura 14. Expresión de TLR2 en astrocitos de corteza WT y HD. Inmunocitoquímica de TLR2 en astrocitos de corteza WT y HD se comparó entre el grupo control (C) y el grupo tratado con 3NP 15 mM por 24 h (3NP). Se muestra la media + ES de fluorescencia de 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías.

Para evaluar la expresión de HMGB1 por otra técnica, realizamos un análisis de expresión de proteínas por *Western Blot* en astrocitos de corteza de ratón WT y HD. Comparamos la expresión de HMGB1 en astrocitos WT y HD sin SFB (control) y en astrocitos tratados con 3NP 15 mM sin SFB (3NP). Los niveles proteicos de HMGB1 mostraron un aumento significativo en astrocitos HD respecto a los WT tanto en el grupo control como en el grupo 3NP (Figura 15). Nuestros resultados sugieren que la expresión de HMGB1 está aumentada en astrocitos HD, frente a la falta de SFB y no se modifican en respuesta a la disfunción mitocondrial.

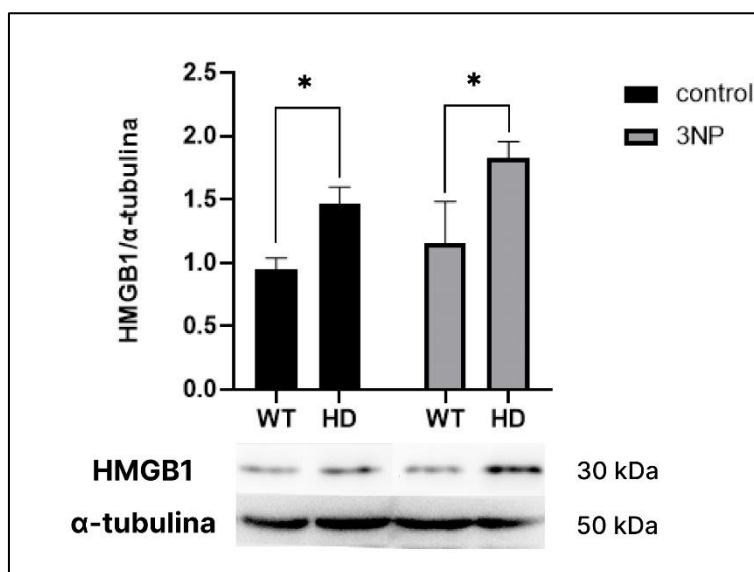


Figura 15. Expresión de HMGB1 en astrocitos de corteza WT y HD. Los astrocitos WT y HD fueron incubados por 24 h en medio sin SFB (control) y con 3NP 15mM sin SFB (3NP). Los extractos de proteínas totales de astrocitos de corteza fueron utilizados para realizar *Western Blot* de HMGB1. Se muestra la media + ES de 4 experimentos expresados como unidades de incremento de la relación HMGB1/α-tubulina. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías. (*p < 0,05 versus WT).

En resumen, los resultados indican que los astrocitos HD expuestos a deprivación de suero aumentan la expresión de HMGB1, mientras que el 3NP no la modifica en astrocitos WT o HD. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la expresión de TLR2 en astrocitos de corteza WT y HD sometidos a estrés o disfunción mitocondrial.

5.5 Microglía

Al evaluar, la expresión de HMGB1 en cultivos de microglía de corteza de ratones HD, encontramos que HMGB1 aumenta significativamente en microglía HD en comparación con microglía WT (Figura 16A). Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión de TLR2 (Figura 16 B). Cuando estudiamos la expresión de otro receptor de HMGB1, TLR4, encontramos que los niveles de TLR4 aumentan en microglía de corteza HD (Figura 16C). Además, evaluamos la expresión de C1qA, la subunidad de la proteína del complemento C1q que aumenta en la inflamación y puede interactuar con HMGB1. Sin embargo, los niveles de C1qA no se modificaron entre la microglía WT y HD (Figura 16D).

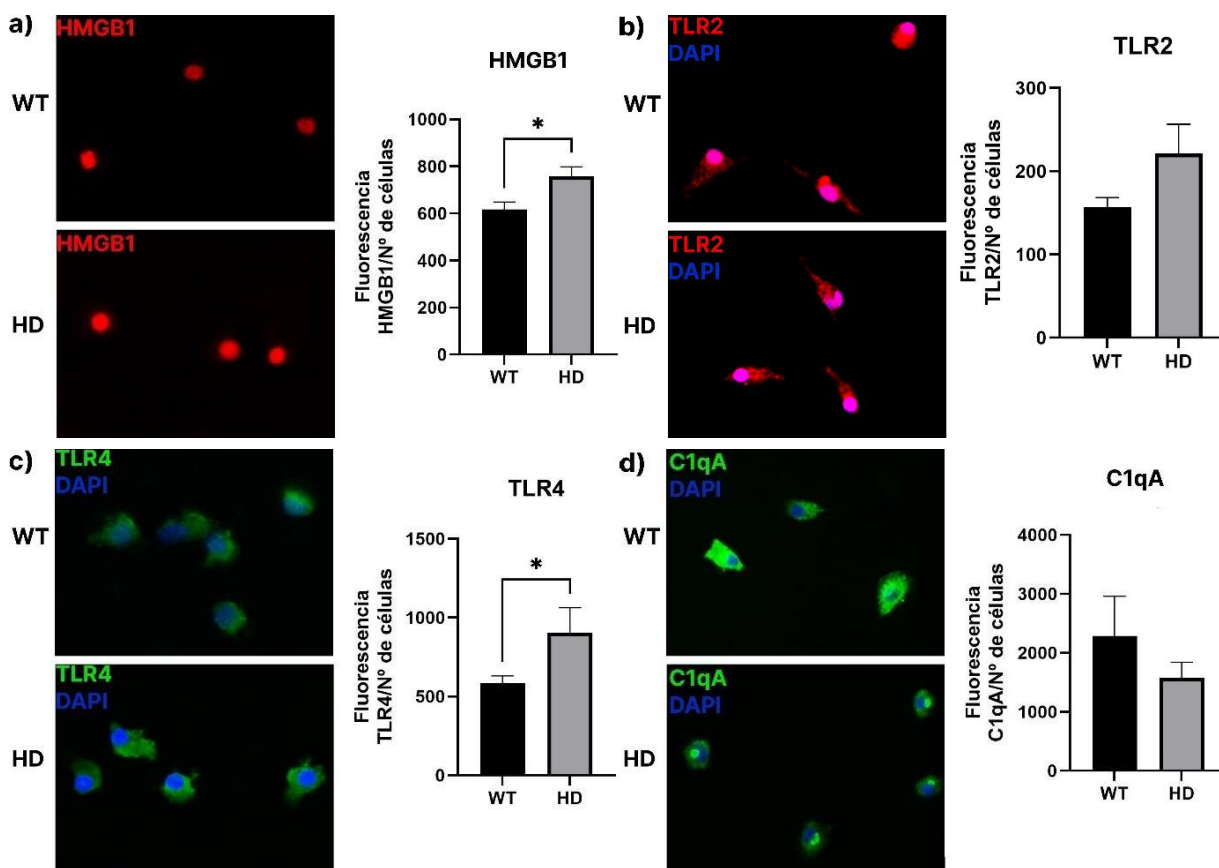


Figura 16. Expresión de HMGB1, TLR2, TLR4 y C1qA en microglía de corteza. Inmunocitoquímica HMGB1 (A) TLR2 (B) TLR4 (C) C1qA (D) en microglía de corteza WT y HD. Se muestra la media + ES de fluorescencia de 4 experimentos independientes. Los datos fueron analizados por el *test t* de Student. (*p < 0,05 vs WT).

Para evaluar el efecto de la disfunción mitocondrial, incubamos la microglía WT y HD en medio sin SFB con 3NP para el grupo tratado (3NP) mientras que el grupo sin tratar se incubo en medio sin SFB (control). En estas células evaluamos el efecto de 3NP en la expresión de HMGB1 y TLR2. Los niveles de expresión de HMGB1 en microglía fueron significativamente más altos en los grupos WT 3NP y HD 3NP en comparación con los grupos WT y HD control (Figura 17).

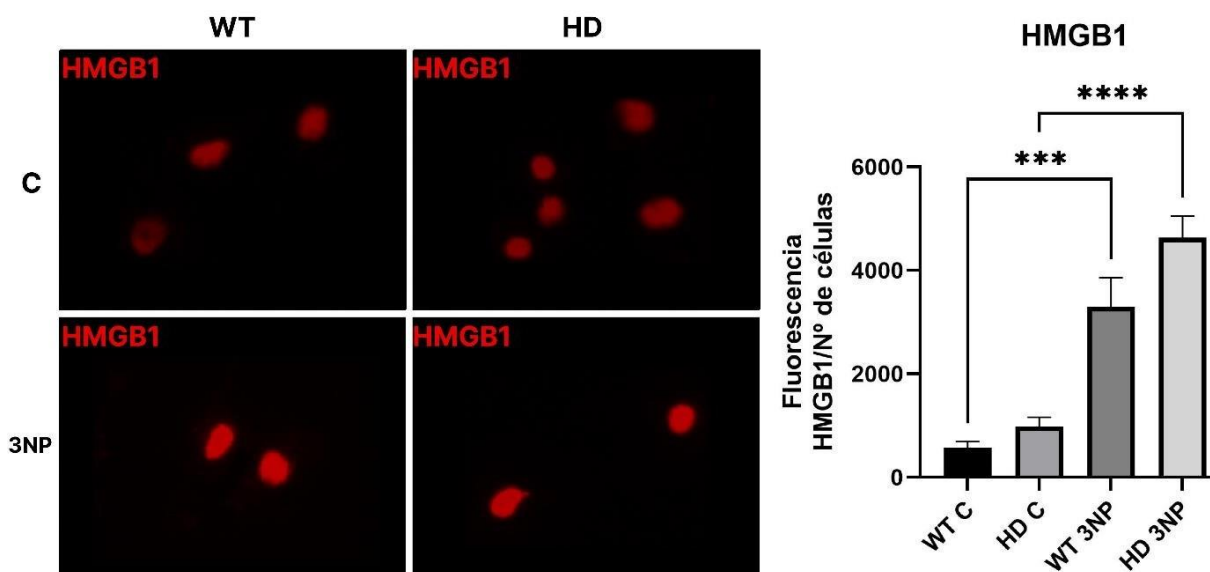


Figura 17. Expresión de HMGB1 en microglía de corteza WT y HD. Inmunocitoquímica de HMGB1 en microglía corteza WT y HD control (C) y tratados con (3NP) 5 mM por 24 h. Se muestra la media + ES de fluorescencia de 4 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías (**p < 0,001, ****p < 0,0001).

Dado que la microglía HD tratada con 3NP muestra mayor expresión de HMGB1, pensamos que puede haber un aumento de C1q acompañando HMGB1. Por ende, decidimos analizar la expresión de C1qA en microglía tratada con 3NP. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión de C1qA en microglía entre ninguno de los grupos analizamos (Figura 18).

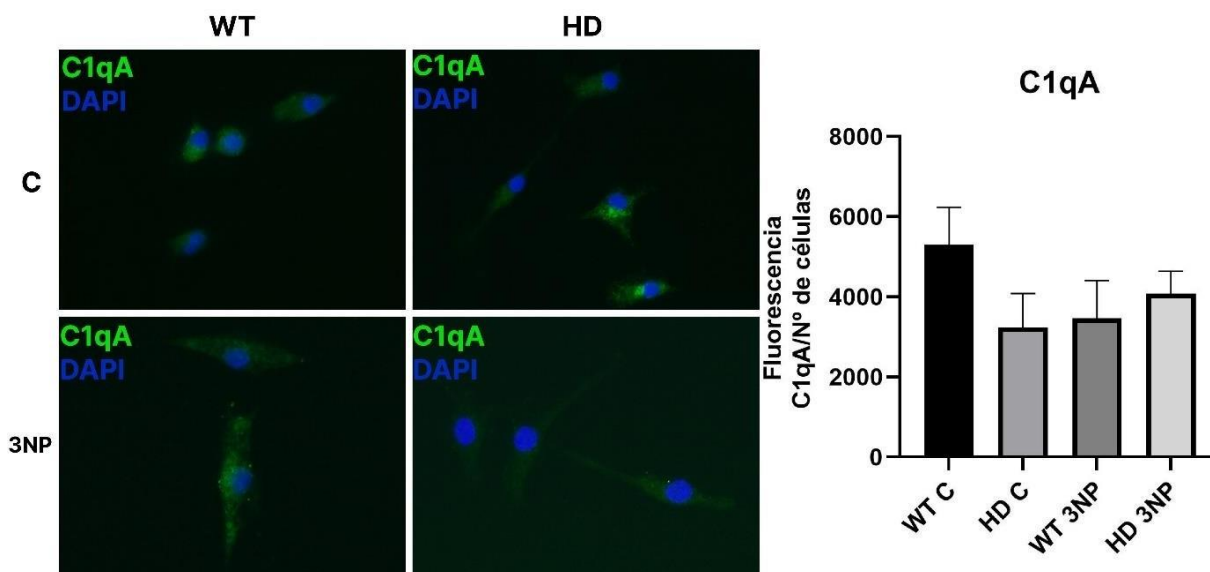


Figura 18. Expresión de C1qA en microglía de corteza WT y HD. Inmunocitoquímica de C1qA en microglía corteza WT y HD control (C) y tratados con 3NP 5 mM por 24 h. Se muestra la media + ES de fluorescencia de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías.

Nuestros resultados sugieren que la expresión de HMGB1 aumenta en microglía de corteza HD en comparación con microglía de corteza WT, y que el tratamiento con 3NP conduce a un aumento mayor de la expresión de HMGB1 en microglía HD. A pesar de que no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión de TLR2 o C1qA entre microglía WT y HD, la expresión de TLR4 aumenta en microglía de corteza HD, sugiriendo que HMGB1-TLR4 podría contribuir a la inflamación en el cerebro HD.

6. Discusión

La HD es un trastorno neurodegenerativo complejo que causa discapacidades motoras, cognitivas y conductuales debido a una mutación en el gen *Htt*. A pesar de una extensa investigación, los mecanismos patogénicos de la enfermedad siguen siendo desconocidos.

HMGB1 es una proteína nuclear que puede ser liberada de neuronas y células gliales y desencadenar una respuesta inflamatoria al activar alguno de sus receptores TLR (Van Beijnum *et al.*, 2008). La expresión de HMGB1 en modelos y pacientes HD no se conoce. HMGB1 puede interactuar con la proteína *mHtt*, lo que puede inducir la salida de HMGB1 del núcleo y aumentar la formación de agregados de *mHtt*. Por lo tanto, investigar la modulación de la expresión de HMGB1 puede ser útil para comprender mejor su papel en la neurodegeneración en HD. En nuestro laboratorio se analizó la expresión de HMGB1 en una línea celular de neuronas de estriado ST14A y se encontró un aumento de HMGB1 nuclear en las células que expresan *mHtt*. También demostramos que el ARNm de HMGB1 aumenta en el cerebro de ratón HD R6/2 y en la sangre de pacientes HD. Por ende, decidimos estudiar la expresión de HMGB1 en la glía de ratones HD. Nuestra hipótesis es que la expresión de HMGB1 podría aumentar en astrocitos y/o microglía HD y que al liberarse podría generar inflamación. En este estudio, analizamos la expresión de HMGB1 y sus receptores en astrocitos y microglía proveniente de ratones Q175 modelo de HD.

En cultivo primario de astrocitos de corteza, nuestros resultados mostraron que la expresión de HMGB1 es mayor en astrocitos en ausencia de SFB, sugiriendo que la expresión de HMGB1 puede aumentar en HD en respuesta a situaciones de estrés. Esto fue confirmado al estudiar la expresión por *Western Blot* donde también se observó un aumento de los niveles proteicos de HMGB1 en astrocitos HD. Sin embargo, la disfunción mitocondrial inducida por 3NP no modificó la expresión de HMGB1 en astrocitos WT y HD. En otro estudio, se demostró que los astrocitos son más resistentes a 3NP (Olsen *et al.* 1999), lo que podría explicar por qué no se encontraron diferencias en la expresión de HMGB1 frente al tratamiento con 3NP.

En microglía HD encontramos un aumento en la expresión de nuclear HMGB1 lo que sugiere que si HMGB1 es liberada puede contribuir a la respuesta inflamatoria en HD. En concordancia, estudios previos mostraron que la microglía HD es reactiva y presenta un incremento en la expresión de IL-6 y TNF- α en microglía primaria de ratones R6/2 y HdhQ175 (Crotti *et al.*, 2014). Aunque este estudio no midió directamente la expresión de HMGB1,

sabemos que los factores inflamatorios pueden aumentar la expresión y liberación de HMGB1 en astrocitos, entonces es posible que lo mismo suceda en microglía. Además, observamos que la disfunción mitocondrial inducida por 3NP provoca un aumento marcado en la expresión de HMGB1 en microglía HD. Estos resultados coinciden con (Qi *et al.*, 2015c) que muestra que 3NP genera un aumento en la expresión del ARNm y la proteína HMGB1 en el cuerpo estriado a 12 y 24 h. Un estudio encontró que la cantidad de microglía activada en el estriado y la corteza se correlacionó directamente con el grado de pérdida neuronal, lo que sugiere que los cambios neuroinflamatorios en microglía podrían cumplir un rol importante en la neurodegeneración de HD (Sapp *et al.*, 2001). Asimismo, otro estudio demostró que la microglía que expresa *mHtt* cuando es co-cultivada con neuronas genera una mayor muerte neuronal inducida por LPS en comparación con microglía WT (Crotti *et al.*, 2014). Por lo tanto, HMGB1 podría ser un factor clave en la activación de la microglía y, en consecuencia, en la neurodegeneración de HD.

En base a los resultados obtenidos, es posible inferir que en la glía HD se produce un aumento de HMGB1, lo que provoca una respuesta reactiva en microglía y astrocitos, lo que a su vez podría contribuir a la muerte neuronal en HD. Estudios previos muestran que la inflamación y reactividad de la microglía están involucrados en la patogénesis de pacientes HD (Björkqvist *et al.*, 2008). De hecho, se han detectado astrocitos y microglía reactivos en el estriado de pacientes con HD (Paul Vonsattel *et al.* 2008). Por lo tanto, es posible que la liberación de HMGB1 desde células gliales reactivas pueda inducir inflamación y/o muerte neuronal, contribuyendo a la patología neuronal observada en HD. Se necesitan estudios adicionales para establecer si HMGB1 es liberada al medio extracelular y para comprender el rol que cumple la liberación de HMGB1 en la neuroinflamación de HD.

Dado que en cerebros HD se encuentran sobreexpresadas varias moléculas proinflamatorias (Saba *et al.*, 2022), quizás la expresión de TLR2, uno de los receptores de HMGB1, se encuentre aumentado contribuyendo al proceso inflamatorio. Nuestros resultados muestran que TLR2 no se modifica ni en astrocitos ni en microglía sugiriendo que TLR2 no desempeñaría un papel importante en la patogénesis de la HD. Sin embargo, un estudio previo (Crotti *et al.*, 2014), encontró que la microglía de ratones HD muestra niveles aumentados de ARNm de TLR2. Aunque estos resultados parecen contradecir los nuestros, es importante señalar que en nuestro estudio la expresión de TLR2 mostró una tendencia a aumentar en microglía HD, pero la diferencia no fue significativa. En conjunto, estos hallazgos sugieren que, aunque TLR2 podría estar involucrado en la patogénesis de la HD, su papel podría ser más

limitado de lo que se pensaba. Es necesario seguir investigando para comprender el papel preciso de TLR2 en HD.

Por otro lado, investigamos la expresión del receptor TLR4 en microglía de la corteza, otro de los receptores de HMGB1. Nuestros resultados mostraron que la expresión de TLR4 aumenta en microglía de ratones HD en comparación con ratones WT. Este resultado concuerda con un estudio previo en el cual se encontró un aumento de TLR4 en el estriado de pacientes con HD (Vuono *et al.*, 2020). Sin embargo, es importante destacar que en este estudio no se encontraron diferencias significativas en la expresión de TLR4 en el tejido cortical de los pacientes con HD. Es probable que este aumento en la expresión de TLR4 sea específico de la microglía y, por lo tanto, difícil de detectar en el cerebro completo, dado que la microglía solo representa entre el 5% y el 10% de las células del cerebro. Por eso, es importante realizar cultivos celulares para analizar la expresión de moléculas en cada tipo celular. Estos hallazgos sugieren que la expresión de TLR4 puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de HD, esto podría influir en la activación de la microglía en regiones específicas del cerebro. Futuros estudios serán necesarios para investigar más en detalle los mecanismos subyacentes al aumento de TLR4 en microglía HD.

Decidimos analizar la expresión de C1qA en microglía de la corteza, ya que HMGB1 puede interactuar con C1q, lo que sugiere la posibilidad de que puedan inducir la neuroinflamación y, a su vez, provocar el deterioro neurodegenerativo en HD. Un estudio previo en ratas *Wistar* tratadas con 3NP (Lopez-Sanchez *et al.*, 2020) mostró un aumento en la expresión de C1q en el estriado, hipocampo y cerebelo. En nuestro trabajo no encontramos diferencias en la expresión de C1qA en microglía de corteza de ratones HD, mientras que astrocitos de corteza no expresan C1qA. Estos resultados podrían sugerir que la respuesta de la expresión de C1q podría variar dependiendo de la región cerebral estudiada. Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

Finalmente, nuestros resultados muestran que la expresión de HMGB1 aumenta en microglía y astrocitos HD, mientras que su receptor TLR4 aumenta en microglía HD y este efecto podría estar involucrado en la patogénesis de HD.

7. Conclusión

En conjunto, estos hallazgos apoyan la idea de que la microglía reactiva y HMGB1 pueden desempeñar un papel importante en la patología de HD. El estudio de HMGB1 es muy importante para establecerlo como un posible objetivo terapéutico para la HD. Se necesita más investigación para dilucidar los mecanismos subyacentes al papel de HMGB1 en la HD y explorar posibles estrategias terapéuticas dirigidas a esta vía. Este trabajo busca destacar la relevancia de la microglía y los astrocitos en enfermedades neurodegenerativas, y promover su estudio como posibles objetivos terapéuticos para la HD.

8. Bibliografía

- Abdelfattah, M. S., Badr, S. E. A., Lotfy, S. A., Attia, G. H., Aref, A. M., Abdel Moneim, A. E., & Kassab, R. B. (2020). Rutin and Selenium Co-administration Reverse 3-Nitropropionic Acid-Induced Neurochemical and Molecular Impairments in a Mouse Model of Huntington's Disease. *Neurotoxicity Research*, 37(1), 77–92. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00086-y>
- Andrade-Navarro, M. A., Mühlenberg, K., Spruth, E. J., Mah, N., González-López, A., Andreani, T., Russ, J., Huska, M. R., Muro, E. M., Fontaine, J. F., Amstislavskiy, V., Soldatov, A., Niefeld, W., Wanker, E. E., & Priller, J. (2020). RNA Sequencing of Human Peripheral Blood Cells Indicates Upregulation of Immune-Related Genes in Huntington's Disease. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.573560>
- Björkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R. V., Benn, C. L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M. A., Hayden, M. R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M. W., Brundin, P., Bates, G. P., ... Tabrizi, S. J. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1869–1877. <https://doi.org/10.1084/jem.20080178>
- Bradford, J., Shin, J.-Y., Roberts, M., Wang, C.-E., Li, X.-J., & Li, S. (n.d.). *Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., & Blum, D. (2005a). 3-Nitropropionic acid: A mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 95, Issue 6, pp. 1521–1540). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x>
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., & Blum, D. (2005b). 3-Nitropropionic acid: A mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 95, Issue 6, pp. 1521–1540). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x>
- Casano, A. M., & Peri, F. (2015). Microglia: Multitasking specialists of the brain. In *Developmental Cell* (Vol. 32, Issue 4, pp. 469–477). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.018>

- Chaganti, S. S., McCusker, E. A., & Loy, C. T. (2017). What do we know about late onset Huntington's disease? In *Journal of Huntington's Disease* (Vol. 6, Issue 2, pp. 95–103). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JHD-170247>
- Cho, K. (2019). Emerging Roles of Complement Protein C1q in Neurodegeneration. In *Aging and Disease* (Vol. 10, Issue 3, pp. 652–663). International Society on Aging and Disease. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.0118>
- Crapser, J. D., Ochaba, J., Soni, N., Reidling, J. C., Thompson, L. M., & Green, K. N. (2020). Microglial depletion prevents extracellular matrix changes and striatal volume reduction in a model of Huntington's disease. *Brain*, *143*(1), 266–288. <https://doi.org/10.1093/brain/awz363>
- Crotti, A., Benner, C., Kerman, B. E., Gosselin, D., Lagier-Tourenne, C., Zuccato, C., Cattaneo, E., Gage, F. H., Cleveland, D. W., & Glass, C. K. (2014). Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nature Neuroscience*, *17*(4), 513–521. <https://doi.org/10.1038/nn.3668>
- Faraco, G., Fossati, S., Bianchi, M. E., Patrone, M., Pedrazzi, M., Sparatore, B., Moroni, F., & Chiarugi, A. (2007). High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry*, *103*(2), 590–603. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04788.x>
- Gatto, E., Parisi, V., Persi, G., Converso, D. P., Etcheverry, J. L., Varela, V., Alba, L., & Fretchel, G. (2012). Clinical and genetic characteristics in patients with Huntington's Disease from Argentina. *Parkinsonism and Related Disorders*, *18*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.09.011>
- Hayakawa, K., Arai, K., & Lo, E. H. (2010). Role of ERK MAP kinase and CRM1 in IL-1 β -stimulated release of HMGB1 from cortical astrocytes. *GLIA*, *58*(8), 1007–1015. <https://doi.org/10.1002/glia.20982>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Khakh, B. S., & Sofroniew, M. v. (2014). Astrocytes and Huntington's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, *5*(7), 494–496. <https://doi.org/10.1021/cn500100r>
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2017). Microglia in steady state. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 127, Issue 9, pp. 3201–3209). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI90602>
- Kim, J. Bin, Joon, S. C., Yu, Y. M., Nam, K., Piao, C. S., Kim, S. W., Lee, M. H., Han, P. L., Park, J. S., & Lee, J. K. (2006). HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute

- neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *Journal of Neuroscience*, 26(24), 6413–6421. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3815-05.2006>
- Kim, S. Y., Son, M., Lee, S. E., Park, I. H., Kwak, M. S., Han, M., Lee, H. S., Kim, E. S., Kim, J. Y., Lee, J. E., Choi, J. E., Diamond, B., & Shin, J. S. (2018). High-mobility group box 1-induced complement activation causes sterile inflammation. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00705>
- Kwon, D. (2021). Failure of genetic therapies for Huntington’s devastates community. *Nature*, 593(7858), 180–180. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01177-7>
- Lee, C. Y. D., Wang, N., Shen, K., Stricos, M., Langfelder, P., Cheon, K. H., Cortés, E. P., Vinters, H. V., Vonsattel, J. P., Wexler, N. S., Damoiseaux, R., Frydman, J., & Yang, X. W. (2020). Disease-related Huntingtin seeding activities in cerebrospinal fluids of Huntington’s disease patients. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77164-1>
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., Poejo, J., Garcia-Lopez, V., Salazar, J., & Gutierrez-Merino, C. (2020). Early reactive a1 astrocytes induction by the neurotoxin 3-nitropropionic acid in rat brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103609>
- Ludolph, A. C., he, F., Spencer, P. S., Hammerstad, J., & Sabri, M. (1991). 3-Nitropropionic Acid - Exogenous Animal Neurotoxin and Possible Human Striatal Toxin. In *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques* (Vol. 18, Issue 4, pp. 492–498). <https://doi.org/10.1017/S0317167100032212>
- Markarian, M., Krattli, R. P., Baddour, J. D., Alikhani, L., Giedzinski, E., Usmani, M. T., Agrawal, A., Baulch, J. E., Tenner, A. J., & Acharya, M. M. (2021). Glia-selective deletion of complement c1q prevents radiation-induced cognitive deficits and neuroinflammation. *Cancer Research*, 81(7), 1732–1744. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2565>
- Menalled, L. B., Kudwa, A. E., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., Ruiz, M., Mushlin, R., Alosio, W., McConnell, K., Connor, D., Murphy, C., Oakeshott, S., Kwan, M., Beltran, J., Ghavami, A., Brunner, D., Park, L. C., Ramboz, S., & Howland, D. (2012a). Comprehensive Behavioral and Molecular Characterization of a New Knock-In Mouse Model of Huntington’s Disease: ZQ175. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049838>

- Menalled, L. B., Kudwa, A. E., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., Ruiz, M., Mushlin, R., Alosio, W., McConnell, K., Connor, D., Murphy, C., Oakeshott, S., Kwan, M., Beltran, J., Ghavami, A., Brunner, D., Park, L. C., Ramboz, S., & Howland, D. (2012b). Comprehensive Behavioral and Molecular Characterization of a New Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease: ZQ175. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049838>
- Min, H. J., Ko, E. A., Wu, J., Kim, E. S., Kwon, M. K., Kwak, M. S., Choi, J. E., Lee, J. E., & Shin, J.-S. (2013). Chaperone-like Activity of High-Mobility Group Box 1 Protein and Its Role in Reducing the Formation of Polyglutamine Aggregates. *The Journal of Immunology*, 190(4), 1797–1806. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202472>
- Motion, A. J., Hunt, M. J., Hodges, A. K., Lewis, P. D., Redfern, A. J., Dunnett, S. B., & Jones, L. (2005). A combination drug therapy improves cognition and reverses gene expression changes in a mouse model of Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 21(4), 855–870. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03895.x>
- Olsen, C., Rustad, A., Fonnum, F., Paulsen, R. E., & Hassel, B. (n.d.). 3-Nitropropionic acid: an astrocyte-sparing neurotoxin in vitro. In *Brain Research* (Vol. 850). www.elsevier.com/locate/bres
- Paul Vonsattel, J. G., Keller, C., & Del Pilar Amaya, M. (n.d.). *Huntington's disease Neuropathology of Huntington's disease*.
- Qi, L., Sun, X., Li, F. E., Zhu, B. S., Braun, F. K., Liu, Z. Q., Tang, J. Le, Wu, C., Xu, F., Wang, H. H., Velasquez, L. A., Zhao, K., Lei, F. R., Zhang, J. G., Shen, Y. T., Zou, J. X., Meng, H. M., An, G. L., Yang, L., & Zhang, X. D. (2015a). Hmgb1 promotes mitochondrial dysfunction-triggered striatal neurodegeneration via autophagy and apoptosis activation. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142901>
- Qi, L., Sun, X., Li, F. E., Zhu, B. S., Braun, F. K., Liu, Z. Q., Tang, J. le, Wu, C., Xu, F., Wang, H. H., Velasquez, L. A., Zhao, K., Lei, F. R., Zhang, J. G., Shen, Y. T., Zou, J. X., Meng, H. M., An, G. L., Yang, L., & Zhang, X. D. (2015b). Hmgb1 promotes mitochondrial dysfunction-triggered striatal neurodegeneration via autophagy and apoptosis activation. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142901>
- Rodríguez, A. M., Delpino, M. V., Miraglia, M. C., Costa Franco, M. M., Barrionuevo, P., Dennis, V. A., Oliveira, S. C., & Giambartolomei, G. H. (2017). Brucella abortus-activated microglia induce neuronal death through primary phagocytosis. *GLIA*, 65(7), 1137–1151. <https://doi.org/10.1002/glia.23149>
- Roos, R. A. C. (2010). Huntington's disease: A clinical review. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-40>
- Saba, J., Couselo, F. L., Bruno, J., Carniglia, L., Durand, D., Lasaga, M., & Caruso, C. (2021). Neuroinflammation in Huntington's Disease: A Starring Role for Astrocyte and

- Microglia. *Current Neuropharmacology*, 20(6), 1116–1143.
<https://doi.org/10.2174/1570159x19666211201094608>
- Saba, J., López Couselo, F., Turati, J., Carniglia, L., Durand, D., De Laurentiis, A., Lasaga, M., & Caruso, C. (2020). Astrocytes from cortex and striatum show differential responses to mitochondrial toxin and BDNF: Implications for protection of striatal neurons expressing mutant huntingtin. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1).
<https://doi.org/10.1186/s12974-020-01965-4>
- Sapp, E., Kegel, K. B., Hashikawa, T., Uchiyama, Y., Tohyama, K., Bhide, P. G., Vonsattel, J. P., & Difiglia, M. (2001). Early and Progressive Accumulation of Reactive Microglia in the Huntington Disease Brain. In *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (Vol. 60, Issue 02). <http://jnen.oxfordjournals.org/>
- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. In *Neuron* (Vol. 89, Issue 5, pp. 910–926). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>
- Shin, J. Y., Fang, Z. H., Yu, Z. X., Wang, C. E., Li, S. H., & Li, X. J. (2005). Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *Journal of Cell Biology*, 171(6), 1001–1012. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508072>
- Silvestroni, A., Faull, R. L. M., Strand, A. D., & Möllera, T. (2009). Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. *NeuroReport*, 20(12), 1098–1103. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832e34ee>
- Singhrao, S. K., Neal, J. W., Morgan, B. P., & Gasque, P. (1999). *Increased Complement Biosynthesis By Microglia and Complement Activation on Neurons in Huntington's Disease*. <http://www.idealibrary.com>
- Sofroniew, M. v. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 5, pp. 249–263). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nrn3898>
- Sofroniew, M. v., & Vinters, H. v. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 7–35). <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Son, M., Porat, A., He, M., Suurmond, J., Santiago-Schwarz, F., Andersson, U., Coleman, T. R., Volpe, B. T., Tracey, K. J., Al-Abed, Y., & Diamond, B. (2016). *C1q and HMGB1 reciprocally regulate human macrophage polarization Key Points*.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016>
- Van Beijnum, J. R., Buurman, W. A., & Griffioen, A. W. (2008). Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). In *Angiogenesis* (Vol. 11, Issue 1, pp. 91–99). <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9093-5>

Vuono, R., Kouli, A., Legault, E. M., Chagnon, L., Allinson, K. S., La Spada, A., Biunno, I., Barker, R. A., & Drouin-Ouellet, J. (2020). Association Between Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) Genetic Variants and Clinical Progression of Huntington's Disease. *Movement Disorders*, 35(3), 401–408. <https://doi.org/10.1002/mds.27911>