

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

EFEITO DO INIBIDOR S-P-BROMOBENZILGLUTATIONA CICLOPENTIL
DIESTER SOBRE A ATIVIDADE DA GLIOXALASE 1 EM CULTURA DE
GLIOMA C6

FRANCIANE LIRIO PEDROSO

Porto Alegre, julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

EFEITO DO INIBIDOR S-P-BROMOBENZILGLUTATIONA CICLOPENTIL
DIESTER SOBRE A ATIVIDADE DA GLIOXALASE 1 EM CULTURA DE
GLIOMA C6

Trabalho apresentado como requisito
parcial para aprovação na Disciplina de Trabalho
de Conclusão do Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FRANCIANE LIRIO PEDROSO

Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Co-orientadora: Profa. Fernanda Hansen

Porto Alegre, julho de 2017

APRESENTAÇÃO

O Trabalho de Conclusão foi elaborado na forma de artigo original para ser submetido à Revista Neuroscience Letters. Foram obedecidas as normas para autores da revista (em anexo).

**EFEITO DO INIBIDOR S-P-BROMOBENZILGLUTATIONA CICLOPENTIL
DIESTER SOBRE A ATIVIDADE DA GLIOXALASE 1 EM CULTURA DE
GLIOMA C6**

Franciane Lirio¹, Fernanda Hansen^{1,2}, Fabiana Galland¹, Marianne Flores¹, Rafaela Ferreira Pacheco¹, Vanessa Silva¹, Carlos-Alberto Gonçalves¹

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

²Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040970, Florianópolis, SC, Brasil

Correspondência: Carlos Alberto Gonçalves, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: +55 51 33085566. Fax: +55 51 33085539. E-mail: casg@ufrgs.br

Resumo

As complicações do diabetes mellitus (DM) têm sido associadas à hiperglicemia e aos altos níveis de compostos reativos, como metilglioxal (MG) e à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Pacientes com DM têm maior risco de desenvolver doenças degenerativas, em especial a doença de Alzheimer (DA). Neste trabalho investigamos o efeito do inibidor seletivo de GLO1, S-p-Bromobenzilglutaciona ciclopentil diester (BBCG), em células de glioma C6. Foi realizada uma curva de tempo e concentração do inibidor BBCG sobre a atividade da GLO1. Pode-se verificar que a partir de 30 minutos com 10 μ M já existe uma inibição significativa da atividade da enzima GLO1, que foi sustentada por 1 hora de incubação. Contudo, não foi verificada inibição em 3 horas e em 24 horas de incubação. O inibidor de GLO1 junto com MG diminuiu significativamente a atividade da GLO1 comparado com o controle, porém essa inibição não difere estatisticamente do inibidor ou MG incubados separadamente. Assim, em culturas de glioma C6, BBCG é um inibidor ativo da atividade da GLO1. Este trabalho abre a possibilidade de uso do inibidor em culturas gliais, bem como em estudos de toxicidade do MG no sistema nervoso central.

Palavras-chave: BBCG; glioxalase 1; glioma C6; metilglioxal

Highlights

- A toxicidade do MG poder ser estudada em cultura celular por adição direta à cultura ou por incubação com inibidor da GLO1
- BBCG mostrou ser inibidor ativo da atividade da GLO1 em culturas de glioma C6
- No entanto, o BBCG não teve um efeito inibidor da GLO1 aditivo ao MG

1. Introdução

O diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia no jejum e dislipidemia. Essa doença tem uma repercussão sistêmica e resulta em complicações graves no sistema nervoso central [1,2] com alto risco de desenvolver doenças degenerativas, em especial a doença de Alzheimer (DA) [3,4]. A doença cursa com elevados níveis de AGEs (*Advanced Glycation Endproducts*) [5], resultantes da glicação proteica tanto diretamente pela glicose ou indiretamente por seu derivado o metilglioxal (MG).

O MG é um composto dicarbonil produzido principalmente através da via glicolítica, a partir de trioses fosfato (dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato) e do metabolismo de corpos cetônicos [6,7]. O MG, que é altamente produzido em condições hiperglicêmicas [8], encontra-se em concentrações elevadas no plasma de pacientes diabéticos e no fluido cefalorraquidiano de pacientes com DA [9,10,11].

As células possuem um sistema de detoxificação do MG, o sistema glioxalase, que converte o MG a D-lactato [12]. O sistema glioxalase é composto por duas enzimas: glioxalase 1 (GLO1) e 2 (GLO2). A primeira etapa usa como substrato glutatona reduzida (GSH), além do MG, produzindo S-D-lactoil-glutatona. Na segunda reação esse composto é hidrolisado originando D-lactato e regenerando GSH [6]. Estudos apontam diminuição na atividade da glioxalase no envelhecimento e nos estágios intermediários e tardios da DA e propõem que essa redução levaria ao aumento da glicação e do dano aos tecidos [13,14] e, supostamente, ao aumento da concentração de MG. Na fase inicial dessa doença ocorre regulação positiva da GLO1, provavelmente de maneira compensatória, para evitar o aumento de MG [15,14].

No sistema nervoso central os astrócitos têm níveis mais elevados do sistema glioxalase, sendo os principais responsáveis pela detoxificação do MG. Além disso, os astrócitos são responsáveis por inúmeras funções incluindo suporte metabólico de neurônios [16], defesa antioxidante, síntese de substratos e reciclagem de neurotransmissores, regulação da barreira hematoencefálica e *clearance* sináptico [17]. Sinais de disfunção dos astrócitos são observados no diabetes mellitus, comprometendo a atividade do sistema nervoso [18,19,20]. O estudo de funções astrocíticas *in vitro* pode ser feito utilizando-se culturas primárias, ou usando a linhagem C6 de glioma de ratos, que apresenta diversas características da cultura primária [21].

Recentemente, um trabalho do nosso grupo mostrou que a exposição de células C6 ao MG causou redução dos níveis de GSH, sem uma alteração significativa no

conteúdo e atividade de GLO1 [21]. Outra abordagem possível seria usar um inibidor de GLO1, que poderia aumentar os níveis endógenos de MG. Neste trabalho investigamos o efeito do inibidor seletivo de GLO1, S-p-Bromobenzilglutathiona ciclopentil diester (BBGC), um inibidor permeável e competitivo da GLO1 [6] em células de glioma C6. Avaliamos se este inibidor poderia ter um efeito aditivo ao do MG.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais. Metilglioxal (MG), brometo de [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT), vermelho neutro (VN), S-p-Bromobenzilglutathiona ciclopentil diester (BBGC), glutathiona (GSH), ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-L-etanossulfônico (HEPES) e materiais de cultura celular da Sigma (Saint Louis, MO, EUA). O Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) e a solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) foram adquiridos da Gibco BRL (Carlsbad, CA, EUA). O soro fetal bovino foi obtido de Cultilab (Campinas, SP, Brasil). Outros reagentes foram comprados de fornecedores locais (Porto Alegre, RS, Brasil).

2.2. Cultura de células de glioma C6. Foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, EUA). Células C6 com alto número de passagens (pelo menos 100) uma linhagem celular semelhante a astrócitos, foram cultivadas em garrafas a uma densidade de 10^4 em DMEM (pH 7,6) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 2,5 mg/mL de fungizona e 100 U/L de gentamicina em 5% de CO₂/95% de ar a 37°C. Após as células atingirem confluência, foram semeadas em placas de 24 poços a densidades de 60.000 células/poço para serem tratadas 48 horas depois. Para realização dos tratamentos, o meio de cultura foi substituído por DMEM sem soro na ausência ou presença de MG por 24 horas [22]. Para realização da curva de tempo e concentração as células C6 foram incubadas com inibidor da enzima GLO1 (S-p-Bromobenzilglutathiona ciclopentil diester) durante diferentes tempos (10, 30, 60 e 180 minutos) e concentrações (2,5, 5, 10 e 20 µM). Quando pertinente, a incubação com o inibidor foi realizada sempre antes da exposição ao MG.

2.3. Ensaio de redução do MTT. No final dos tratamentos, as células foram tratadas com MTT 0,5 mg/mL durante 30 minutos em 5% de CO₂/95% de ar a 37°C. O meio foi removido e os cristais de MTT foram dissolvidos em DMSO. Os valores de absorbância foram medidos a 560 e 650 nm. A redução de MTT foi calculada pela seguinte fórmula:

[(abs 560 nm) - (abs 650nm)] [23]. Os resultados foram expressos como percentagens do controle.

2.4. Ensaio de incorporação de vermelho neutro. No final dos tratamentos, as células foram tratadas com 50 µg/ mL de VN durante 30 minutos em 5% de CO₂/95% de ar a 37°C. As células foram então lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 5 minutos de cada vez. O corante VN que foi absorvido por células viáveis foi então extraído com 500 µL de ácido acético/etanol/água (1/50/49, v/v). Os valores de absorbância foram medidos a 560 nm [24]. Os resultados foram expressos como percentagens do controle.

2.5. Avaliação do sistema da glioxalase. As culturas C6 foram primeiro lisadas e homogeneizados em tampão fosfato cloreto de potássio, pH 7,4. Os homogeneizados de células foram então centrifugados a 6.000 g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a atividade enzimática e dosagem do conteúdo de proteína. A atividade da GLO1 foi então determinada como anteriormente descrito [25], com algumas modificações. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços utilizando um espectrofotômetro de microplacas (UV Star - Greiner). A mistura reacional (200 µL/poço) continha tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,2), MG 2 mM e GSH 1 mM (pré-incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente). A amostra foi adicionada ao tampão (concentração de proteína 10-15 µg por poço). A formação de S-(D)-lactoilglutationa foi linear e monitorada, a cada minuto, durante 15 minutos, a 240 nm e 30° C. Uma unidade de atividade de GLO1 é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de S-(D)-lactoilglutationa por minuto. A atividade específica foi calculada e após, expressa como percentagem do controle.

2.6. Dosagem de proteína. O conteúdo de proteínas foi medido utilizando o método de Lowry, modificado por Peterson utilizando albumina bovina como padrão [26].

2.7. Análise estatística. Os dados estão mostrados como média ± erro padrão e foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando p<0,05. Todas as análises foram feitas em SPSS IBM versão 20.

3. Resultados

3.1 Curva de tempo e concentração do inibidor da GLO1 na atividade da GLO1. A fim de avaliar o efeito do inibidor utilizado sobre a atividade da GLO1 foi realizada uma curva de tempo e concentração. As células de glioma C6 foram tratadas com diferentes concentrações do inibidor BBGC (2,5 a 20 μM), em 10, 30, 60, 180 minutos e 24 horas. A atividade da GLO1 foi significativamente reduzida com a concentração de 10 μM nos tempos de 30 e 60 minutos em relação ao controle, em 11% e 16%, respectivamente (Figura 1C). Nas concentrações de 2,5, 5 e 20 μM em 10, 30, 60, 180 minutos (Figura 1A,1B,1D) e 24 horas (dados não mostrados) não foi observada inibição da GLO1.

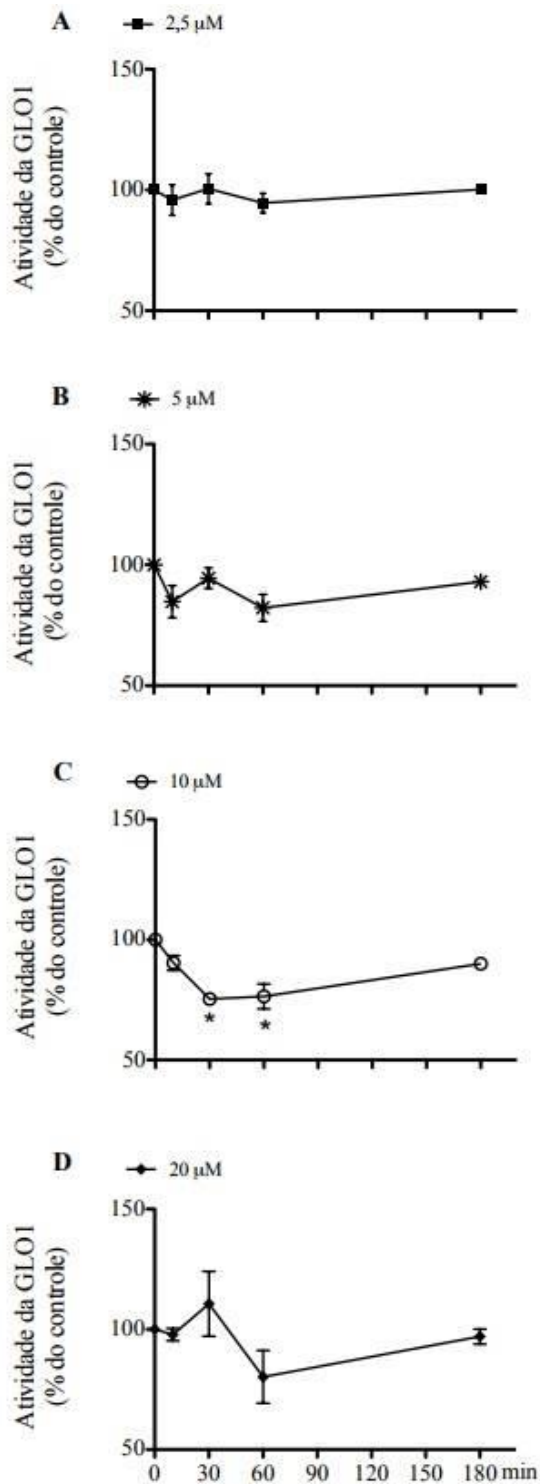


Fig. 1. Curva de tempo e concentração do inibidor da GLO1, BBCG. As células de glioma C6 foram tratadas com diferentes concentrações do inibidor (2,5, 5, 10 ou 20 μM) por 10, 30, 60 ou 180 minutos. Os dados estão representados como média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata a partir do ensaio de atividade da GLO1. O valor do controle é assumido como 100%. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo teste de Duncan, assumindo $p < 0,05$. *Significativamente diferente do controle.

3.2 Efeito do inibidor de GLO1 e do veículo na viabilidade celular e na atividade da GLO1 em células C6. Células de glioma C6 foram expostas a concentração de 10 μ M do inibidor de GLO1 durante 60 minutos a fim de avaliar se os tratamentos realizados eram capazes de alterar a viabilidade das células C6 e se o veículo poderia interferir na atividade da GLO1. A viabilidade celular foi avaliada através dos ensaios de redução de MTT e de incorporação de VN (Figura 2). Não se observou diferença significativa nos dois parâmetros de viabilidade celular investigados (Figura 2A e 2B) tanto com inibidor da GLO1 quanto com o veículo. Em relação a atividade da GLO1, verificou-se novamente que o inibidor de GLO1 diminuiu significativamente a atividade da GLO1 e que este efeito não foi mediado pela presença do veículo (Figura 2C).

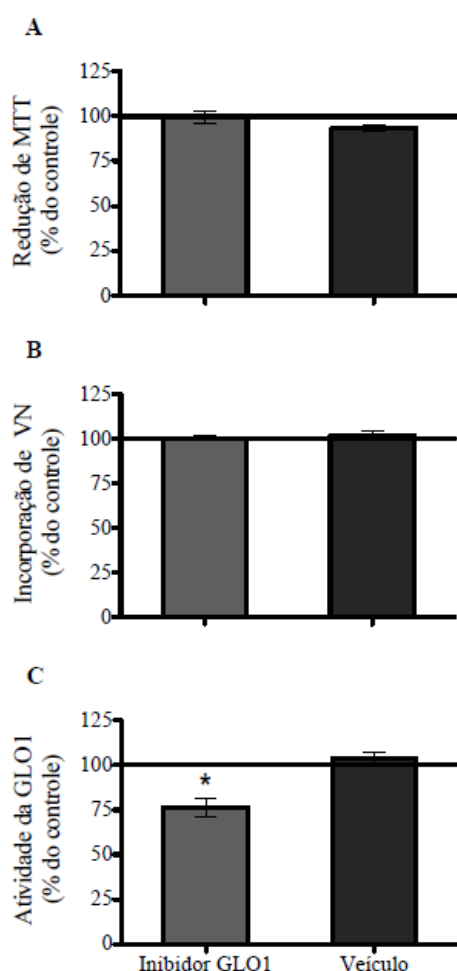


Fig. 2. Efeito do inibidor de GLO1 na viabilidade celular e na atividade da GLO1 em células C6. A redução de MTT (A), a incorporação de VN (B) e a atividade da GLO1 (C) foram avaliadas após 60 minutos de incubação com 10 μ M do inibidor de GLO1. O veículo corresponde ao DMSO 0,1%. Nos testes de redução de MTT e de incorporação de VN, os dados estão representados como média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, assumindo o valor do controle como 100%. Os dados da atividade da GLO1 estão expressos com média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por

ANOVA de 1 via seguido pelo teste de Duncan, assumindo $p < 0,05$. *Significativamente diferente do controle e do veículo.

3.3 O inibidor da GLO1 e o MG diminuíram a atividade da GLO1. A fim de investigar se o tratamento com MG impactaria na atividade da GLO1 quando as células C6 já estão com a atividade da enzima reduzida, foi realizada incubação com inibidor de GLO1, BBCG, na concentração de $10 \mu\text{M}$ por 30 minutos e, após, adicionado MG $400 \mu\text{M}$. O tratamento com inibidor de GLO1 e/ou MG foi capaz de reduzir significativamente a atividade da enzima GLO1 quando comparado somente com o controle, em 14%, 18%, 14%, respectivamente (Figura 3). É importante mencionar que não se observou redução significativa da atividade da GLO1 quando as células de glioma C6 foram incubadas com o inibidor na concentração de $10 \mu\text{M}$ por 24 horas (dados não mostrados), indicando, portanto, que o efeito de inibição é transitório.

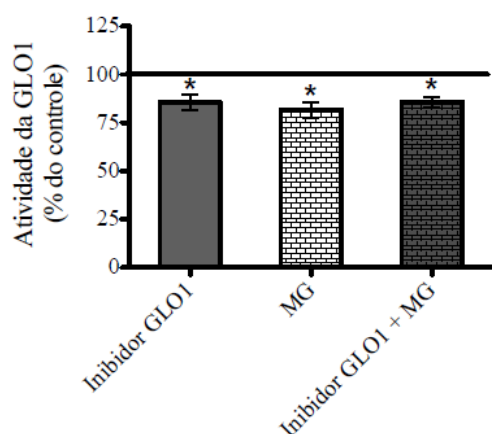


Fig. 3. Efeito do inibidor de GLO1 ($10 \mu\text{M}$) e MG ($400 \mu\text{M}$) na atividade da GLO1. As células de glioma C6 foram incubadas por 30 minutos com inibidor de GLO1 (grupo inibidor GLO1) ou DMEM sem soro e, após, adicionou-se MG ($400 \mu\text{M}$) (grupo inibidor GLO1 + MG) por 24 horas. Os dados estão expressos com média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata, assumindo o valor do controle como 100%. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo teste de Duncan, assumindo $p < 0,05$. *Significativamente diferente do controle.

4. Discussão

A manipulação do sistema glioxalase, especificamente da GLO1 por ser a enzima limitante deste sistema, através da superexpressão ou inibição desta enzima, tem sido utilizada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de verificar os efeitos de alterações nas concentrações de MG e dos AGEs derivados deste composto

[27,28,29]. A atividade da enzima GLO1 previne o acúmulo de MG e de outros dicarbonis reativos, além de diminuir as reações de glicação mediadas por dicarbonis [30]. Os inibidores da GLO1 derivados da S-benzilglutathione são potentes inibidores desta enzima. Dentre estes inibidores, BBCG é um inibidor competitivo da GLO1 [6] que foi capaz de elevar os níveis endógenos de MG [27,29]. Com este inibidor complementamos um estudo do efeito da alteração nas concentrações de MG sobre a atividade da GLO1 em células de glioma C6.

Inicialmente, foi realizada uma curva de tempo e concentração do inibidor BBCG sobre a atividade da GLO1. Pode-se verificar que a partir de 30 minutos com 10 μM já existe uma inibição significativa da atividade da enzima GLO1, que foi sustentada até 1 hora. Nas demais concentrações e tempos avaliados não foram verificadas alterações significativas na atividade da GLO1. Os resultados estão de acordo com dados existentes na literatura, os quais mostram que na concentração de 10 μM durante 1 hora de incubação há aumento dos níveis endógenos de MG em eritrócitos, células HL60 e células endoteliais [6,27,29].

O inibidor utilizado foi diluído em DMSO, conforme instrução do fabricante. Tendo em vista que estudos mostram que a concentração de DMSO deve ser limitada pois pode causar efeitos neurotóxicos foi avaliado o efeito do inibidor e do veículo, DMSO 0,1% [31,32]. Primeiramente, a fim de elucidar se o efeito do inibidor da GLO1 teria influência da concentração de veículo utilizado foi realizada a medida da atividade da GLO1. O veículo, na concentração testada, não foi capaz de alterar a atividade da GLO1. Ademais, quando avaliamos o efeito do inibidor de GLO1 e do veículo na viabilidade celular (com base nos ensaios de redução do MTT e incorporação de VN) não se observou diferença significativa quando as células C6 foram tratadas com 10 μM do inibidor de GLO1 durante 60 minutos. Também avaliamos a viabilidade celular quando com a incubação do inibidor de GLO1 (10 μM) e/ou MG (400 μM) durante 30 minutos e não foi observada alteração nos ensaios de MTT e NR (dados não mostrados). Como a partir de 30 minutos já é verificada inibição significativa da atividade da GLO1, foi adicionado MG (na concentração de 400 μM) após 30 minutos de incubação com inibidor e avaliada a atividade da GLO1. O inibidor de GLO1 + MG diminuiu significativamente a atividade da GLO1 comparado com o controle, porém não diferente estatisticamente do inibidor e do MG incubados separadamente. Isso indica que não houve um efeito aditivo de inibição entre o MG e o BBCG. Cabe mencionar que usamos MG em alta concentração. Contudo valores nessa ordem já foram usados

em culturas celulares [33,34,35,36,37], bem como foram encontrados no plasma de pacientes diabéticos não controlados [38].

Outro aspecto importante é de que não se pode afirmar que, efetivamente, há um aumento das concentrações intracelulares de MG verificadas somente pela inibição da atividade da enzima GLO1 com BBCG. Sabe-se que o sistema glioxalase é o principal sistema de detoxificação do MG, porém não é o único. Outros sistemas utilizam o MG como substrato, tais como: o sistema das redutases, porém de menor relevância quando comparada com o sistema glioxalase, este sistema inclui a aldeído redutase e a carbonil redutase [39]. Apesar dessa limitação, o estudo da inibição da atividade da GLO1 com BBCG pode auxiliar a compreender como as células se adaptam a alterações no principal sistema de defesa dos carbonis reativos.

Além da inibição da GLO1 diretamente, a utilização de inibidor da síntese de GSH também pode ser uma ferramenta adicional para estudar alterações no sistema glioxalase, tendo em vista que a GSH é um co-substrato na reação da GLO1 [6]. Outra perspectiva interessante deste trabalho seria avaliar o efeito protetor de agentes antiglicantes, como a aminoguanidina ou da metformina, uma biguanida amplamente usada como medicamento antidiabético, contra a exposição de altos níveis de MG ou a inibição da GLO1.

5. Conclusão

Em suma, este trabalho mostrou que o BBCG é um inibidor ativo da atividade da GLO1 em culturas de glioma C6. A concentração de 10 μ M por 1 hora, aponta uma cinética de inibição similar à observada em outras células. O inibidor não afetou a viabilidade celular nessa concentração. E seu veículo (DMSO, 0,1%) *per se* não afetou a viabilidade celular, nem teve efeito sobre a atividade da GLO1. O BBCG não teve um efeito inibidor aditivo ao MG. Este trabalho abre a possibilidade de uso do inibidor em culturas gliais, bem como em estudos de toxicidade do MG no sistema nervoso central.

Referências

- [1] Gispen, W.H., Biessels, G.J., 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23, 542–549.
- [2] Bauduceau, B., Bourdel-Marchasson, I., Brocker, P., Taillia, H., 2005. The brain of the elderly diabetic patient. *Diab. Metab.* 2, 5S92–5S97.
- [3] Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5:64-74.
- [4] Kopf D, Frolich L (2009) Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *J Alzheimers Dis* 16:677–685.
- [5] Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.
- [6] Thornalley PJ. 1993. The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med* 14:287-371.
- [7] Amicarelli F, Colafarina S, Cattani F, Cimini A, Di Ilio C, Ceru MP, Miranda M. 2003. Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radic Biol Med* 35:856-871.
- [8] Lee HK, Seo IA, Suh DJ, Lee HJ, Park HT (2009) A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in neuroglial cells. *J Neurochem* 108:273–284. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05764.x
- [9] McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH (1994) Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 87:21-29.
- [10] Beisswenger PJ, Howell SK, Russell GB, Miller ME, Rich SS, Mauer M (2013) Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. *Diabetes Care* 36:3234–3239. doi:10.2337/dc12-2689

- [11] Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R, Traldi P (2003) Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med* 41:1166–1173. doi:10.1515/CCLM.2003.180
- [12] Vander Jagt DL, Hunsaker LA (2003) Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact* 143-144:341-351.
- [13] Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei- Jadidi R, Dawnay A (2003) Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* 375:581–592.
- [14] Kuhla B, Boeck K, Schmidt A, Ogunlade V, Arendt T, Munch G, Lüth HJ (2007) Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 28:29-41.
- [15] Kuhla B, Luth HJ, Haferburg D, Boeck K, Arendt T, Munch G (2005) Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1043:211-216.
- [16] Pellerin L (2005) How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol* 32:59-72.
- [17] Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- [18] Barber, A.J., Antonetti, D.A., Gardner, T.W., 2000. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3561–3568.
- [19] Valastro, B., Cossette, J., Lavoie, N., Gagnon, S., Trudeau, F., Massicotte, G., 2002. Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus. *Diabetologia* 45, 642–650.

[20] Revsin, Y., Saravia, F., Roig, P., Lima, A., de Kloet, E.R., Homo-Delarche, F., de Nicola, A.F., 2005. Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. *Brain Res.* 1038, 22–31.

[21] F. Hansen , F. Galland , F. Lirio , D.F. de Souza, Ré. C. Da , R.F. Pacheco , A.F. Vizuite, A. Quincozes-Santos , MC. Leite , C.A. Gonçalves, “Methylglyoxal Induces Changes in the Glyoxalase System and Impairs Glutamate Uptake Activity in Primary Astrocytes,” *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:9574201. doi:10.1155/2017/9574201.

[22] D. F. de Souza, M. C. Leite, A. Quincozes-Santos, P. Nardin, L. S. Tortorelli, M. M. Rigo, C. Gottfried, R. B. Leal, and C. A. Goncalves, “S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway,” *J Neuroimmunol*, vol. 206, no. 1-2, pp. 52–57, 2009.

[23] M. B. Hansen, S. E. Nielsen, and K. Berg, “Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill,” *J Immunol Methods*, vol. 119, no. 2, pp. 203– 210, 1989.

[24] M. C. Leite, F. Galland, D. F. de Souza, M. C. Guerra, L. Bobermin, R. Biasibetti, C. Gottfried, C. A. Goncalves, “Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices,” *J Neurosci Res*, vol. 87, no. 11, pp. 2439–2446, 2009.

[25] B. Mannervik, A. C. Aronsson, E. Marmstal, and G. Tibbelin, “Glyoxalase I (ratliver),” *Methods Enzymol*, vol. 77, pp. 297–301, 1981.

[26] G. L. Peterson, “A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable,” *Anal Biochem*, vol. 83, no. 2, pp. 346–356, 1977.

[27] Thornalley PJ, Edwards LG, Kang Y, Wyatt C, Davies N, Ladan MJ, Double J (1996) Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro

and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochem Pharmacol* 51:1365-1372

[28] Kuhla B, Luth HJ, Haferburg D, Weick M, Reichenbach A, Arendt T, Munch G (2006) Pathological effects of glyoxalase I inhibition in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 83:1591-1600.

[29] Nigro C, Raciti GA, Leone A, Fleming TH, Longo M, Prevezano I, Fiory F, Mirra P, D'Esposito V, Ulianich L, Nawroth PP, Formisano P, Beguinot F, Miele C (2014) Methylglyoxal impairs endothelial insulin sensitivity both in vitro and in vivo. *Diabetologia* 57:1485-1494.

[30] Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger PJ, Thorpe SR, Onorato J, Brownlee M (1998) Overexpression of glyoxalase I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycaemia induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest* 101: 1142–1147.

[31] Zhang C, Deng Y, Dai H, Zhou W, Tian J, Bing G, Zhao L. Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. *Brain Res Bull.* 2017 Jan;128:34-39. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.11.004. Epub 2016 Nov 9. PubMed PMID: 27836802.

[32] Penazzi L, Lorengel J, Sündermann F, Golovyashkina N, Marre S, Mathis CM, Lewejohann L, Brandt R, Bakota L. DMSO modulates CNS function in a preclinical Alzheimer's disease model. *Neuropharmacology.* 2017 Feb;113(Pt A):434-444. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.10.020. Epub 2016 Oct 20. PubMed PMID: 27773645.

[33] S. Di Loreto, V. Zimmitti, P. Sebastiani, C. Cervelli, S. Falone, F. Amicarelli, "Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 40, no. 2, pp. 245-257, 2008.

- [34] M. Bélanger, J. Yang, J. M. Petit, T. Laroche, P. J. Magistretti, and I. Allaman, "Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection," *J Neurosci*, vol. 31, no. 50, pp. 18338-18352, 2011.
- [35] J. M. Chu, D. K. Lee, D. P. Wong, R. N. Wong, K. K. Young, C. H. Cheng, and K. K. Yue, "Ginsenosides attenuate methylglyoxal-induced impairment of insulin signaling and subsequent apoptosis in primary astrocytes," *Neuropharmacology*, vol. 85, pp. 215-223, 2014.
- [36] F. Amicarelli, S. Colafarina, F. Cattani, A. Cimini, C. Di Ilio, M. P. Ceru, and M. Miranda, "Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury," *Free Radic Biol Med*, vol. 35, no. 8, pp. 856-871, 2003.
- [37] M. Kawaguchi, N. Shibata, S. Horiuchi, and M. Kobayashi, "Glyoxal inactivates glutamate transporter-1 in cultured rat astrocytes," *Neuropathology*, vol. 25, no. 1, pp. 27-36, 2005.
- [38] Lapolla A, Reitano R, Seraglia R, Sartore G, Ragazzi E, Traldi P (2005) Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol Nutr Food Res* 49:685-690.
- [39] Vander Jagt DL, Hunsaker LA (2003) Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact* 143-144:341-351.