

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Lílian Juliana Lissner

Efeito da administração intracerebroventricular de metilglioxal sobre a função
astroglial no hipocampo e barreira hematoencefálica

Porto Alegre

Junho de 2021

Lílian Juliana Lissner

Efeito da administração intracerebroventricular de metilglioxal sobre a função
astroglial no hipocampo e barreira hematoencefálica

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas
da Saúde da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial para a
obtenção do título de doutora em
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Porto Alegre

Junho de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Lissner, Lillian Juliana
Efeito da administração intracerebroventricular de metilglioxal sobre a função astrogliar no hipocampo e barreira hematoencefálica / Lillian Juliana Lissner.
-- 2021.
111 f.
Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Metabolismo da glicose. 2. Metilglioxal . 3. Astrócitos . 4. Alzheimer . 5. Diabetes. I. Gonçalves, Carlos Alberto Saraiva, orient. II. Título.

Continue a nadar, continue a nadar!

Dory – Procurando Nemo, 2003.

AGRADECIMENTOS

Ao CA, meu orientador. Meu desejo de gente grande é que um dia eu tenha a metade da sabedoria que tu tens. E não estou falando apenas àquilo que se refere a excelência profissional, mas principalmente no exemplo de humanidade. Obrigada pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades que tens me dado nesses quatro anos.

A Krista, àquela que as jornadas no laboratório me trouxeram essa grande amiga. Não tenho palavras para agradecer os ensinamentos que tens compartilhado comigo, por estar sempre 100% disponível a ajudar, pela competência e dedicação.

Ao Eder, vulgo “mozão” (ou seria o contrário), meu bolsista e meu grande amigo. Obrigada pela oportunidade de te “orientar” como pós-graduanda. Pelas discussões enriquecedoras, pela dedicação e companheirismo, muito obrigada.

Obrigada Lets, por compartilhar comigo tudo que essa mente brilhante é capaz. Obrigada pela disposição sempre presente, pela amizade e apoio.

Ao Nicky. Obrigada pelas belas palavras sobre a vida, pelo apoio, amizade e aos memes diários (incluindo o momento cultural). Obrigada por tornar a jornada tão leve e divertida.

Falando do cotidiano no laboratório, quanto abençoados somos pelo ambiente que criamos, as histórias que vivemos né, Aline, Barbara, Jessica e Anderson.

A Fernanda Hansen. Teu jeito leve de ver o mundo, me trouxe momentos de calma. Muito obrigada pela contribuição tanto a nível profissional quanto fora do laboratório.

A todos os colegas do laboratório 31 e 33, pela convivência, bons momentos e café, nesses 4 anos. Obrigada.

Ao Professor Guglielmo Sorci, pela oportunidade em fazer parte do seu grupo de pesquisa durante o doutorado sanduíche. Um agradecimento em especial a Sara Chiappalupi, *pós doc*, pela incansável dedicação e por compartilhar comigo todos os ensinamentos. Também agradeço a todos os membros do seu laboratório, especialmente a Laura e Aleksandra, pelos tão especiais momentos vividos. “Un abbraccione da Liliana”! Juntamente a isso, à bela cidade de Perugia, às tantas experiências fantásticas vividas.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica, em especial a àqueles que tiveram uma participação direta na minha formação. A Cleia e o Giordano, pela eficiência, agilidade e modelo de trabalho em todos esses anos.

A UFRGS, pelo acesso ao ensino de excelência.

Ao CNPq, pela bolsa e valiosas oportunidades durante a realização desse trabalho.

Aos animais de experimentação por nos conceber a vida para a pesquisa.

A todos os professores e profissionais que fizeram parte da minha trajetória acadêmica.

Agradeço aos meus pais, Nilson e Orildes, pelo exemplo de caráter e humildade e pela educação que vocês me proporcionaram pra que, embora frente a todas as dificuldades, hoje eu pudesse estar aqui escrevendo esse agradecimento nessa tese. Amo vocês.

Aos meus amigos, todos aqueles que me acompanharam e tornaram os momentos mais bonitos e leves durante todos esses anos.

A Matteo, mio amore. O inesperado mais esperado na minha vida. Grazie per l'amore e compagnia. Ti amo.

À beleza da vida.

RESUMO

O metilglicoxal (MG) é um composto dicarbonil, formado a partir de fontes exógenas e endógenas. A taxa de formação do composto depende do metabolismo e tipo celular e pelas condições fisiológicas, sendo, endogenamente, a via glicolítica, a mais importante fonte de produção. Níveis elevados de glicose estão relacionados ao acúmulo de MG no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR), em doenças como o diabetes mellitus (DM) e a doença de Alzheimer (DA). A alta reatividade do MG leva a modificações de proteínas e outras biomoléculas, gerando produtos finais de glicação avançada (AGEs), apontados como mediadores nessas desordens neurodegenerativas. Além da glicação, outros efeitos resultantes de altos níveis de MG no sistema nervoso central (SNC) são envolvidas na direta modulação da neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica, com evidências sugerindo que os efeitos do MG podem ser relacionados a mudanças comportamentais e disfunção glial. No SNC, os astrócitos são mais suscetíveis ao dano para o estresse dicarbonílico, embora essas células apresentam um sistema glioxalase mais eficiente quando comparado com neurônios, sugerindo um aumento no dano funcional neuronal sob complicações diabéticas e em desordens neurodegenerativas. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de altas concentrações de MG no SNC. Foi avaliado como a administração intracerebroventricular (ICV) de MG (3 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) causa mudanças comportamentais como o declínio cognitivo e ansiedade bem como alterações bioquímicas no hipocampo, soro e LCR. Além disso, nós investigamos a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) relacionada às funções astrocitárias no hipocampo. MG induziu, 12 h após a sua administração, um decréscimo na atividade locomotora no campo aberto e efeitos ansiolíticos nos ratos submetidos ao Teste do labirinto em cruz elevado. Subsequentemente, 36 h após a cirurgia ICV, a injeção de MG também induziu prejuízo cognitivo nas memórias de curto e longo prazo, avaliado pela tarefa do reconhecimento de objetos. Foi avaliado também a memória espacial de curto prazo, avaliada pelo teste do Y-maze. Setenta e duas horas após infusão do MG, a captação de glutamato, a atividade da glutamina sintetase e os níveis da glutatona foram diminuídos em relação ao grupo SHAM. Interessantemente, os níveis da proteína astrocitária, S100B, estavam aumentados no LCR, o que foi acompanhado pelo decréscimo na expressão do RNAm da S100B hipocampal, mas não nos níveis da proteína. Não houve mudanças no conteúdo do receptor para AGEs (RAGE). Além disso, nós observamos uma perda na integridade da BHE, avaliada pela entrada do corante azul de Evans blue no tecido cerebral e de albumina no LCR. Além destas alterações, houve decréscimo nos níveis da aquaporina-4 e conexina-43 no tecido hipocampal. A expressão gênica (RNAm) de dois importantes fatores de transcrição da resposta antioxidante, Nf κ B e Nrf2, não foram alterados no hipocampo. Contudo, a hemeoxigenase-1 (HO-1) foi aumentada no grupo tratado com o MG. Em conjunto, esses dados corroboram com a ideia de que os astrócitos, as principais células responsáveis pelo clearance do MG, são alvos na toxicidade do MG e que a disfunção da BHE induzida por este composto podem contribuir nas alterações cognitivas e comportamentais observadas nesses animais. Isso nos ajuda a melhorar nosso entendimento de como produtos derivados do metabolismo da glicose podem induzir a disfunções cognitivas observadas em pacientes diabéticos bem como em outras condições neurodegenerativas, e uma melhor definição do papel dos astrócitos nas doenças e terapêutica.

ABSTRACT

Methylglyoxal (MG) is a dicarbonyl compound, formed from exogenous and endogenous sources. The formation rate of compound depends on metabolism and cell type and physiological conditions, which the glycolytic pathway represents the most important endogenous production source. Elevated blood glucose levels are related to MG accumulation in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) diabetes mellitus and Alzheimer's disease (AD). The high reactivity of MG leads to modification of proteins and other biomolecules, generating advanced glycation end products (AGEs) appointed as mediators in these neurodegenerative diseases. In addition to protein glycation, other effects resulting from high levels of MG in the central nervous system (CNS) may involve the direct modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission, with evidence suggesting that the effects of MG may be related to behavioral changes and glial dysfunction. In the CNS, astrocytes are more susceptible to damage of dicarbonyl stress, although they have an improved glyoxalase system when compared to neurons, suggesting an increased neuronal functional damage under diabetic complications and neurodegenerative disorders. In view of this, the aim of this study was evaluating the direct influence of high concentration of MG in the CNS. It was evaluated how intracerebroventricular (ICV) administration (3 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) cause behavioral changes, as cognitive decline and anxiety as well as biochemical alterations in the hippocampus, serum and CSF. Furthermore, we investigated the blood-brain barrier (BBB) integrity related to astrocytic functions in the hippocampus. MG induced, 12h after injection, a decrease in locomotor activity in the Open field (OF) and anxiolytic effects in rats submitted to elevated plus-maze (EPM). Subsequently, at 36 h after ICV surgery, MG injection also induced cognitive impairment in both short and long-term memory, as evaluated by novel object recognition tasks, and in short-term spatial memory, as evaluated by the Y-maze test. 72h after infusion of MG, hippocampal glutamate uptake decreased and glutamine synthetase activity and glutathione levels diminished. Interestingly, the astrocytic protein, S100B, was increased in the cerebrospinal fluid, accompanied by decreased hippocampal S100B mRNA expression, without any change in protein content and hippocampal contents of RAGE. In addition, we observed a loss of BBB integrity, as assessed by the entry of Evans dye into brain tissue and albumin in the CSF, as well as a decrease of aquaporin-4 and connexin-43 in hippocampal tissue. The mRNA expressions of two important transcription factors of antioxidant response - Nf κ B and Nrf2, were not changed. However, hemeoxygenase-1 was upregulated in MG-treated group. Taken together, this data corroborates with the idea that astrocytes, the main cells responsible for MG clearance, are targets of MG toxicity and that BBB dysfunction induced by this compound may contribute to behavioral and cognitive alterations observed in these animals. It helps us an improve our understanding of how this product of glucose metabolism can induce the brain dysfunction observed in diabetic patients, as well as in other neurodegenerative conditions, and further defines the role of astrocytes in disease and therapeutics.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADHs - aldeído-desidrogenases
- AG – Aminoguanidina
- AGEs – Produtos finais de glicação avançada
- AKRs - aldo-ceto redutases
- AQP4 – Aquaporina 4
- ARE – elemento-resposta antioxidante
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BHE – Barreira hematoencefálica
- BSA – Albumina sérica bovina
- CEL – Carboxi-etil-lisina
- CML – Carboxi-metil-lisina
- Cx43 – Conexina 43
- DA- Doença de Alzheimer
- DM – Diabetes Mellitus
- DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2
- DNA – ácido deoxiribonucleico
- EROs – espécies reativas de oxigênio
- GABA – Ácido gama-aminobutírico
- GABA_AR – Receptor do ácido gama-aminobutírico tipo A
- GFAP – Proteína glial fibrilar ácida
- GLAST – Transportador Glutamato-Aspartato
- Glo1 – Glioxalase 1

Glo2 – Glioxalase 2

GLT-1 – Transportador de glutamato tipo 1

GLUTs- Transportadores de glicose

GS – Glutamina sintetase

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

HMGB1 – Proteína (High mobility group Box-1)

HO-1 – Hemi oxigenasse 1

ICV- Intracerebroventricular

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IRS-1 – Substrato do receptor de insulina

JNK - c-Jun N-terminal cinase

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MG – Metilglioxal

MG-Hs – Hidroimidazolonas derivadas do MG

Nf κ B – Fator nuclear de cadeia κ de linfócitos B

NMDA – N-metil-D-aspartato

Nrf2 – Fator nuclear eritroide 2

RAGE – Receptor de produtos finais de glicação avançada

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

SGLTs – Transportadores de glicose dependentes de sódio

SNC – Sistema nervoso central

APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada em seções organizadas da seguinte maneira: Introdução, Resultados (Capítulo I, Capítulo II), Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências Bibliográficas e Anexo. Na Introdução, são apresentados os temas estudados, a fundamentação teórica que nos levou ao desenvolvimento deste trabalho e os focos de estudo, descritos no item Objetivos.

A seção de Resultados está dividida em dois capítulos, de acordo com os diferentes focos de estudo. Em cada capítulo estão descritos os materiais e métodos utilizados bem como os resultados obtidos, sendo o primeiro capítulo o artigo científico publicado.

Capítulo I: Short-term alterations in behavior and astroglial function after intracerebroventricular infusion of methylglyoxal in rats. Este capítulo refere-se aos objetivos I a II.

Capítulo II: Acute methylglyoxal-induced damage in blood-brain barrier and hippocampal tissue. Este capítulo refere-se ao objetivo III.

A Discussão contém a argumentação bibliograficamente embasada da interpretação e da importância dos resultados obtidos nos dois capítulos. A seção conclusões aborda as hipóteses concluídas na tese. Nas perspectivas, estão elucidados os próximos passos para que as novas abordagens suscitadas pela tese possam ser investigadas a fim de colaborar para que o capítulo II seja publicado na forma de artigo científico, e complementar o entendimento acerca da linha de estudo. A seção referências bibliográficas lista elementos bibliográficos utilizados na redação da tese.

Nessa tese, foi incluso como anexo, resultados parciais referentes ao período da realização do doutorado sanduíche no departamento de Medicina Experimental da Universidade de Perugia, Itália sob a orientação do professor Guglielmo Sorci. Todas as

atividades realizadas estavam vinculadas ao projeto: Toxicidade do MG mediando a via RAGE/Nrf2 em células gliais.

SUMÁRIO

PARTE I

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Metabolismo da glicose no sistema nervoso central.....	16
1.2	A formação do MG	19
1.3	AGEs derivados do MG.....	20
1.3.1	Efeitos secundários da glicação	22
1.4	O sistema glioxalase e o MG	23
1.5	Níveis de MG em condições fisiológicas e patológicas.....	26
1.6	MG – Um biomarcador para Diabetes mellitus	29
1.7	Relação entre o DM e o SNC.....	30
1.8	MG, Diabetes e SNC	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo geral	35
2.2	Objetivos específicos	35

PARTE II

3	CAPÍTULO I.....	38
4	CAPÍTULO II.....	53

PARTE III

5	DISCUSSÃO	80
6.	CONCLUSÃO	96
7.	PERSPECTIVAS	97

8. REFERÊNCIAS	98
9. ANEXO	120

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo da glicose no sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) é caracterizado pelo requerimento de uma alta demanda energética. O principal substrato energético para o desempenho das funções é a glicose (Mergenthaler *et al.*, 2013). Embora o cérebro represente apenas 2% da massa corporal (Molina; Dimaio, 2012), é responsável por consumir aproximadamente 25% da energia derivada da glicose (Bordone *et al.*, 2019). Apesar de a concentração de glicose possa diferir em diferentes áreas do cérebro, com um acréscimo pós-prandial (Burdakov; Luckman; Verkhratsky, 2005; Thorens, 2011), os níveis basais fisiológicos são mantidos rigorosamente estáveis, permitindo a manutenção das atividades funcionais (Koekkoek; Mul; La fleur, 2017). A polaridade e concomitante hidrofiliidade apresentada pela molécula de glicose exige a presença de transportadores específicos, como os transportadores de glicose (GLUTs) e/ou transportadores dependentes de sódio (SGLTs), para que esta possa atravessar a membrana plasmática celular (Szablewski, 2017). A distribuição e expressão das diferentes isoformas dos GLUTs e SGLTs são específicos de cada célula, e também dependentes das condições fisiológicas e do desenvolvimento (Patching, 2017). GLUT1 é a isoforma mais abundante nas células que formam a barreira hematoencefálica (BHE) (células endoteliais e plexos coróides), astrócitos e células endimárias que revestem os ventrículos cerebrais (Gonçalves, 2019; Welcome and Mastorakis, 2018). Neurônios expressam principalmente GLUT3, embora alguns (no hipocampo, cerebelo e hipotálamo) expressam GLUT4 (transportador de glicose sensível a insulina) (Choeiri *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2012) e SGLT1 (no hipocampo e córtex cerebral) (Yu *et al.*, 2010). Além disso, outros transportadores como o GLUT2, GLUT (6-8) e SGLT (1-2) tem sido observados nas células e unidades neuro vasculares da BHE (Patching, 2017).

Sob concentrações fisiológicas, a entrada de glicose dá-se através dos GLUTs (Lund-Andersen, 1979; Patching, 2017). A glicose derivada do sangue, atravessa células endoteliais da BHE, principalmente via GLUT1, alcançando o fluido intersticial e dessa forma é rapidamente absorvida por astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, alcançando estruturas mais distantes (Harris et al., 2012; Navale and Paranjape, 2016; Patching, 2017). Os níveis intracelulares de glicose são mantidos pelo balanço entre as taxas de influxo, efluxo e metabolismo e, uma vez dentro das células a glicose é fosforilada pela enzima hexoquinase a glicose-6-fosfato, a qual pode ser então metabolizada por três vias principais: a glicólise, vias das pentoses e glicogênese (em astrócitos) (Bélangier et al., 2011; Pellerin, 2018). Dessa forma, intermediários dessas vias como aminoácidos (alanina, glicina, glutamina e serina) e moléculas neurotransmissoras/neuromoduladoras (aspartato, GABA, glutamato, lactato) são gerados, os quais podem regular atividades de diversas estruturas e funções celulares (Alle et al., 2009; Dienel, 2019; Mergenthaler et al., 2013; Pellerin and Magistretti, 1994; Serres et al., 2005; Zielke et al., 2009).

Existem inúmeros debates acerca das taxas de glicose utilizada como substrato nas interações metabólicas entre astrócitos e neurônios (Allaman et al., 2015; Bélangier et al., 2011; Juaristi et al., 2019). Alguns estudos defendem que os neurônios sustentam uma taxa mais alta de metabolismo oxidativo em comparação com as células gliais (Itoh et al., 2003; Lebon et al., 2002; Lopez-Fabuel et al., 2016) e a utilização de lactato como substrato energético, inclusive quando a glicose está disponível (Bouzier-Sore et al., 2006; Itoh et al., 2003). Porém, um estudo de (Dienel, 2019), considerando frações de volume/tipo de células, apresentou que essa a taxa de oxidação da glicose se assemelha ou até se apresenta mais alta em astrócitos. Somado a isso, é sabido que os astrócitos apresentam uma alta captação de glicose e taxa glicolítica (Bittner, 2010; Herrero-Mendez et al., 2009), a qual é catabolizada e liberada como ATP ou convertida a lactato

ao meio extracelular, dependendo do tipo e necessidade celular (Bouzier-Sore et al., 2006; Itoh et al., 2003; Lovatt et al., 2007; Serres et al., 2005) (Figura 1).

A via glicolítica não é inócua para as células, uma vez que gera inevitavelmente subprodutos altamente reativos como o metilgloxal (MG) (Allaman et al., 2015; Dienel, 2019). O acúmulo permanente de MG nas células é deletério, desde que esse composto é um dos mais potentes agentes glicantes (Rabbani and Thornalley, 2012; Thornalley, 2005; Thornalley and Rabbani, 2011a). Para manter-se em níveis baixos e não-tóxicos, a detoxificação do MG é realizada, majoritariamente pelo sistema de enzimas glioxalase (Rabbani, 2015).

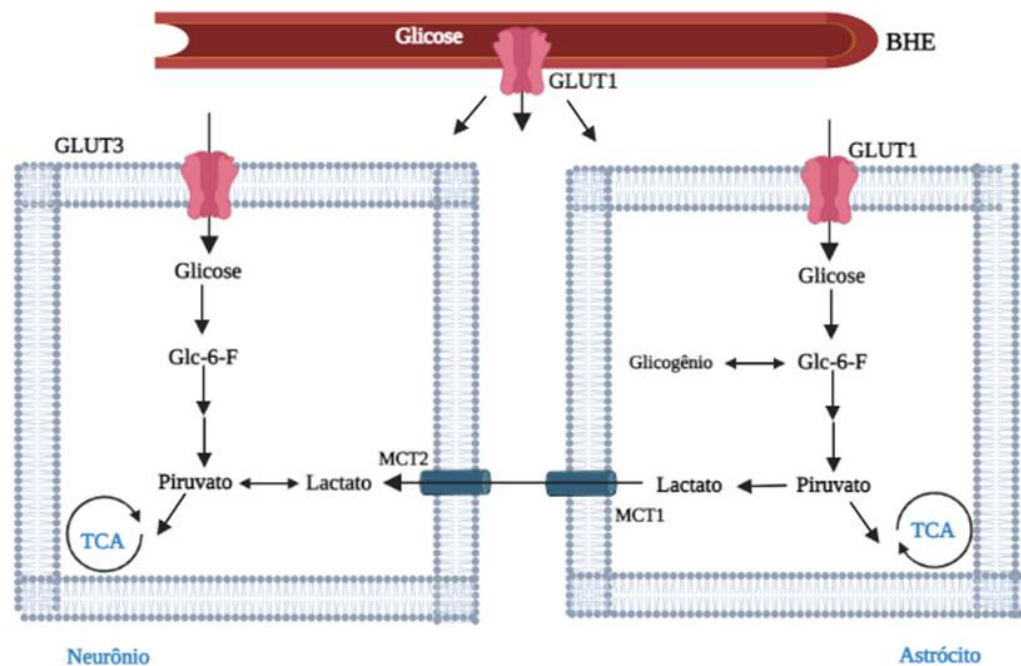


Figura 1. Metabolismo da glicose e geração de substratos astrócitos-neurônios. Adaptado de (Pellerin, 2018) e (Mergenthaler et al., 2013). Para a confecção da figura foi usado o programa Biorender.

1.2 A formação do MG

O MG é um composto dicarbonil com peso molecular de 72kDa, representado pela fórmula química $C_3H_4O_2$ (Phillips and Thornalley, 1993) (Figura 2). Pode ser originado de formas endógenas e exógenas (Kalapos, 2013). Endogenamente, é formado principalmente a partir de dois intermediários da via glicolítica, as triose-fosfato (diidroxiacetona-fosfato e o gliceraldeído-fosfato) através da fragmentação e eliminação espontânea (não enzimática), ou pela ação da triose-fosfato isomerase do grupo fosfato (Pompliano et al., 1990; Richard, 1993; Thornalley, 1996). Vale ressaltar também que o MG pode ser formado a partir de várias vias metabólicas nas quais as triose-fosfatos são intermediárias, como a gliconeogênese e a gliceroneogênese (Rabbani and Thornalley, 2015), através do metabolismo dos corpos cetônicos, com a ação das enzimas citocromo P450, mieloperoxidase e o catabolismo do aminoácido treonina (Phillips and Thornalley, 1993). O MG pode ser gerado também de forma não-enzimática pela lenta degradação da glicose e dos produtos de Amadori através da reação de Maillard (Thornalley, 1998), e em processos de peroxidação lipídica (Shibamoto, 2006; Vander Jagt and Hunsaker, 2003).

De forma exógena, a formação do MG via degradação de proteínas glicadas e monossacarídeos, ocorre em alimentos e bebidas durante o processamento e armazenamento prolongado (Nemet et al., 2006). A composição lipídica e presença de monossacarídeos (Nemet, 2006), além de fatores como temperatura e o tempo de preparação dos alimentos influenciam na maior formação do MG (Martins et al., 2003). O MG presente nos alimentos é rapidamente degradado e/ou reage com as proteínas antes da absorção no trato gastrointestinal e, portanto, parece não contribuir diretamente sobre os níveis totais no organismo (Degen et al., 2013; Nemet et al., 2006). Porém, seu papel através da dieta se dá indiretamente como precursor nos processos de glicação, com a

formação dos chamados produtos de glicação avançada (do inglês, AGEs). AGEs são formados durante o cozimento dos alimentos, e concentrações circulantes desses compostos no organismo podem influenciar em alterações metabólicas como a geração de inflamação, estresse oxidativo e uma propensão à resistência à insulina (Sandu et al., 2005; Uribarri et al., 2005).

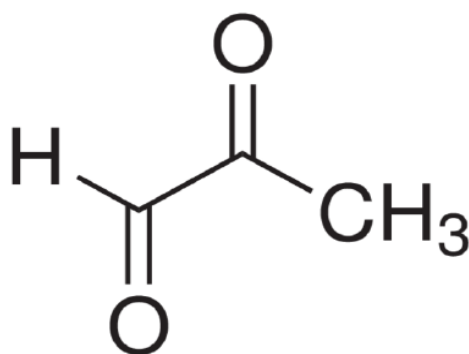


Figura 2. Fórmula estrutural do metilglioxal, C₃H₄O₂. Nome IUPAC: 2-Oxopropanal 72,06 g/mol. Adaptado de (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2021).

1.3 AGEs derivados do MG

Reações de glicação são processos endógenos que contribuem para modificações translacionais de proteínas ocorrendo através de complexas e sequenciais séries de reações chamadas coletivamente de reações de Maillard (Rabbani and Thornalley, 2012). A reação de Maillard é dividida em três estágios: inicial, intermediário e tardio (Lapolla et al., 2005). No estágio inicial, a glicose e/ou outros açúcares redutores reagem com grupos amino de várias biomoléculas formando base de Schiff. Através do rearranjo estrutural, essa base dá origem ao produto de Amadori, o qual *in vivo*, alcança o equilíbrio dinâmico (em 15-20 dias) acumulando-se em proteínas de vida curta e longa (Lapolla et al., 2005). A partir do estágio intermediário, o produto de Amadori através de reações de oxidação e desidratação podem degradar-se em vários compostos α -oxoaldeídico, entre eles o MG, glioxal e deoxyglucosonas (Rabbani and Thornalley, 2012). O estágio tardio

é representado por reações de oxidação, desidratação e ciclização destes compostos com grupos amino livres formando AGEs. Além disso, a formação de AGEs pode dar-se também através da via direta na qual níveis elevados de MG reagem com proteínas (Lapolla et al., 2005).

Embora os níveis plasmáticos de MG são aproximadamente 50000 vezes menores, a reatividade para a glicação é de até 20000 vezes maior quando comparado com a glicose. Dessa forma, a formação dos adutos de proteínas através da glicação mediada pelo MG *in vivo* ocorre em um fluxo muito semelhante ao da glicação mediada pela glicose (Thornalley, 2005). Inúmeras proteínas como a hemoglobina, proteínas mitocondriais histonas ou moléculas como a GSH sofrem alterações estruturais e funcionais através da glicação mediada pelo MG (Bose, 2013; Galligan et al., 2018; Kalapos, 2008a; Morcos et al., 2008).

O principal aminoácido afetado pela glicação do MG é a arginina, resultando na perda da carga positiva com formação de hidroimidazolonas derivadas do MG (MG-Hs). Estas podem apresentar-se sob três formas estruturais (MG-H1), MG-H2 e MG-H3 (Rabbani and Thornalley, 2008; Xue et al., 2012). MG-H1 corresponde a 90% dos adutos (Rabbani and Thornalley, 2012), seguida por menores proporções formadas a partir da glicação da lisina pelo MG, a carboxi-etil-lisina (CEL) e a carboxi-metil-lisina (CML). Proteínas modificadas pela presença de resíduos de MG-H1 em sua estrutura são direcionadas para proteólise (Ahmed et al., 2005a; Dobler et al., 2006; Dudek et al., 2005; Hernebring et al., 2006). Elevadas concentrações de CEL e MG-H1 foram encontradas no LCR de pacientes com a doença de Alzheimer (DA) (Ahmed et al., 2005b) e no plasma e urina de indivíduos com diabetes mellitus (DM) (Ahmed et al., 2003; Beisswenger and Miller, 2013; Karachalias et al., 2010). Ratos nefrectomizados apresentaram um aumento de adutos livres MG-H1, com ausência no conteúdo de resíduos de MG-H1 em proteínas

plasmáticas, indicando que o *clearance* é realizado principalmente na excreção (Rabbani et al., 2007). Além disso, o MG pode reagir com a deoxiguanosina, formando derivados de imidazopurinona, contribuindo em processos para a glicação do ácido desoxirribonucléico (DNA) (Schalkwijk and Stehouwer, 2020; Tamae et al., 2011); quando ligados DNA-MG formam um aduto chamado MGdG {metilglioxal-3-(2'-deoxiribosil)-6,7-dihidro-6,7-dihidroxi-6/7-metilimidazo-[2,3-b] purina-9(8) -um}, o qual foi associado com quebras na cadeia do DNA (Thornalley and Rabbani, 2011b). Ao mesmo tempo, *crosslinks* induzidos pelo MG entre a DNA polimerase e o DNA inibem a replicação do DNA (Murata-Kamiya and Kamiya, 2001). Além disso, o mal enovelamento de proteínas modificadas pelo MG são mais susceptíveis e direcionadas ao proteasoma para proteólise (Rabbani and Thornalley, 2018), processo que pode ocasionar mudanças na transcrição gênica, um aumento na apoptose e dano celular (Ramasamy et al., 2006).

1.3.1 Efeitos secundários da glicação

A extensão da glicação de proteínas pelos compostos carbonílicos em condições fisiológicas é baixa (1-5%), mas pode exacerbar-se durante o envelhecimento e em situações patológicas (Rabbani and Thornalley, 2015). A presença de proteínas glicadas na matriz celular e extracelular desencadeia disfunções mitocondriais, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Morcos et al., 2008) e ativação de processos direcionados a apoptose (Chan et al., 2007). Na BHE, a glicação induzida pelo MG acarreta prejuízos na funcionalidade e integridade nas células endoteliais (Beeri, 2011; Li et al., 2015; Rabbani and Thornalley, 2015), aumentando a secreção de citocinas como a IL-6 e IL-8, ocasionando uma maior permeabilidade da BHE e mudanças na morfologia celular (Hussain, 2016; Tóth et al., 2014a), bem como um decréscimo na expressão de

proteínas *tight junctions* como as ocludinas, claudinas e zona occludens-1 (ZO-1) (Li, 2013; Tóth et al., 2014b).

Os AGEs podem interagir com diferentes receptores celulares, como o receptor para os AGEs (*do inglês*, RAGE) (Ramasamy et al., 2011). Além de neurônios e micróglia, o RAGE é expresso na superfície celular de astrócitos (Gonzalez-Reyes and Rubiano, 2018). O receptor apresenta três domínios extracelulares (V, C1 e C2), uma hélice transmembrana e uma cauda citoplasmática curta (Palanissami and Paul, 2018). O domínio V do receptor pode se ligar a vários ligantes incluindo AGEs, proteínas intracelulares dependentes de cálcio, como a S100B, a proteína do grupo de alta mobilidade box 1, HMGB1, o peptídeo β -amilóide e moléculas DAMPs (*do inglês*, *Damage-associated molecular patterns*), já a parte intracelular medeia a sinalização celular (Gonzalez-Reyes and Rubiano, 2018).

A interação AGEs-RAGE podem desencadear uma cascata de sinalização intracelular, como a geração de ERO via NADPH oxidase e também a ativação do fator de transcrição: fator nuclear kappa B (Nf κ B). Esse efeito gera um aumento da expressão de genes inflamatórios e a formação e liberação de citocinas pró-inflamatórias e ERO, assim como o aumento da expressão do próprio RAGE, amplificando dessa forma a sua resposta (Saleh et al., 2019). Devido ao grande número de interações/ligantes, o envolvimento do papel do RAGE em vários processos fisiológicos e patológicos é amplamente estudado.

1.4 O sistema glioxalase e o MG

No organismo dos eucariontes e procariontes, as células possuem diferentes mecanismos de detoxificação dos propagadores dicarbonil (Phillips and Thornalley, 1993; Vander Jagt and Hunsaker, 2003). O sistema glioxalase, presente no citosol da

maioria das células, desempenha o papel de defesa celular contra a glicação e estresse oxidativo provenientes da toxicidade do MG e de outros compostos dicarbonis (Kalapos, 2008a; Thornalley, 1993a). Este sistema de enzimas, catalisadas pela glioxalase 1 (Glo1) e a glioxalase 2 (Glo2), é dependente de glutathiona reduzida (GSH). O MG reage com a GSH e forma hemitioacetal. Glo1 converte o hemitioacetal em S-D-lactoilglutathiona, esta por sua vez, é utilizada como substrato para a Glo2 que catalisa a sua hidrólise levando à formação de uma molécula de D-lactato e regenerando a GSH em sua forma reduzida inicial (Figura 3) (Allaman et al., 2015; Rabbani and Thornalley, 2012; Thornalley, 1993b, 2005). A primeira etapa catalisada pela Glo1 é o passo limitante da reação e a eficácia no reciclamento de GSH nesse processo está intimamente relacionado com o status no estresse oxidativo celular. O transiente decréscimo na concentração de GSH pode levar ao aumento das taxas de glutathiona oxidada (GSSG/GSH) e NADP/NAPPH (Dringen, 2000).

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* mostraram que, no SNC, os astrócitos apresentam uma maior resistência a toxicidade do MG devido a uma maior eficiência em ambas as enzimas que compõem o sistema glioxalase, bem como uma maior capacidade compensatória nos níveis de GSH quando comparado com os neurônios (Belanger et al., 2011; Dringen, 2000). A imunoreatividade para a Glo1 foi observada ao longo de todo filamento GFAP-positivo (Allaman et al., 2015) em células astrocíticas isoladas do córtex (Belanger et al., 2011), e uma expressão duplamente maior no RNAm da Glo1 em cultura de astrócitos isolados (Cahoy et al., 2008) quando comparado com neurônios e demais células no SNC. Estudos de viabilidade celular apresentaram que culturas neuronais hipocámpais foram afetadas já em baixas concentrações de MG (de Arriba et al., 2007; Di Loreto et al., 2004, 2008), enquanto que a integridade celular de culturas de astrócitos ou linhagem C6, concentrações de até 1 mM não ocasionaram danos (Belanger

et al., 2011; Hansen et al., 2012). Interessantemente, em altas concentrações de MG em co-culturas com astrócitos, neurônios são protegidos da toxicidade do composto (Belanger et al., 2011).

Embora há uma grande eficiência e atividade da Glo1, devido a maior distribuição nos tecidos (Rabbani et al., 2016), outras enzimas podem ser envolvidas na detoxificação do MG nas células: as enzimas aldo-ceto redutases (AKRs) e as aldeído-desidrogenases (ADHs), formando hidroxí-acetona e piruvato, respectivamente, como produto da reação (Vander Jagt and Hunsaker, 2003) (Rabbani et al., 2016). Tem sido demonstrado que na ausência do sistema glioxalase, as AKRs compensariam efetivamente na prevenção ao acúmulo do MG (Schumacher et al., 2018). Somado a isso, recentemente, inúmeros estudos têm reportado o envolvimento da proteína DJ-1 (também conhecido como PARK7) na degradação do MG. Diferentemente do sistema glioxalase, a DJ-1 é capaz de neutralizar o efeito do MG quando este ainda se encontra conjugado com grupos tiois celulares (Andreeva et al., 2019; Jiang et al., 2021; Matsuda et al., 2017).

O controle do estresse oxidativo apresentado pelas enzimas responsáveis pela degradação do MG são reguladas através de fatores de transcrição como o Nrf2 (Fator nuclear eritroide 2). O Nrf2, em condições fisiológicas basais, é mantido no citoplasma de forma inativa, ligado com Keap 1 (um complexo de proteínas associadas) (Xue et al., 2012). Sob estado oxidativo, Nrf2 se desliga do Keap 1 e se transloca ao núcleo, ligando-se ao elemento resposta-antioxidante (ARE) (presente em todos os genes regulados por Nrf2) (Liu et al., 2017), ou ao elemento de resposta nas regiões promotoras dos genes que codificam moléculas antioxidantes (Zoja et al., 2015).

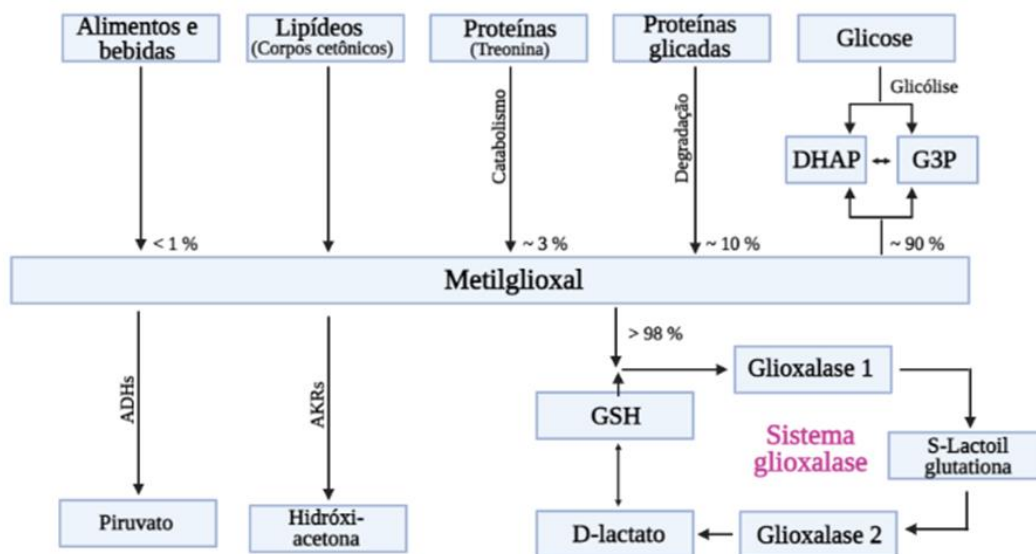


Figura 3. Vias metabólicas e fontes de formação e degradação do metilglioxal. Adaptado de (Bélanger et al., 2011) e (Schalkwijk and Stehouwer, 2020). Para a confecção da figura foi usado o programa Biorender.

1.5 Níveis de MG em condições fisiológicas e patológicas

Considerando a importância energética primária da glicólise na maioria dos tecidos, a formação de MG ocorre em todos as células e organismos (Angeloni et al., 2014; Kalapos, 2008b; Nemet et al., 2006). Embora a concentração de MG é dependente da especificidade do tecido, estima-se que 0.1-0.4% do fluxo glicolítico resulta na formação de MG (Kalapos, 2008b). Em humanos, a taxa de formação sistêmica é de $120\mu\text{mol/kg/dia}$ (Thornalley, 1998b). Células e tecidos apresentam concentrações de 2 - $4\mu\text{M}$ (Dobler et al., 2006; Nicolay et al., 2006), 100nm no plasma (Beisswenger et al., 1999; Nicolay et al., 2006) e níveis estimados entre 10 - $20\mu\text{M}$ no LCR (Kuhla et al., 2005). Isso significa que a formação periférica e até a circulação sistêmica do MG podem acessar e afetar o SNC, uma vez que é uma molécula capaz de se difundir através da membrana plasmática, portanto, capaz de permear também a BHE (Distler et al., 2012).

Em condições fisiológicas o MG se apresenta em três formas dinamicamente equilibradas: a forma não-hidratada, monoidratada e a diidratada, sendo a monoidratada a mais prevalente (McLellan and Thornalley, 1992; Nemet et al., 2004). A desidratação do MG é um passo limitante para definição no tempo de meia vida (aproximadamente 4 minutos) durante a permeabilização à membrana plasmática, que se dá através da difusão passiva (Rabbani and Thornalley, 2014a). Todavia, considerando o metabolismo do MG pelo sistema glicoxalase, a meia vida seria de cerca de 10 minutos (Rabbani and Thornalley, 2014a). O MG formado nas células pode se difundir através do fluido intersticial para o plasma /ou células de outros tecidos (Rabbani and Thornalley, 2015). A maior parte do MG lábil (> 99%) está ligada reversivelmente a GSH e grupos tiois (Rabbani and Thornalley, 2014a). Ligações irreversíveis a proteínas no plasma ocorrem em 3,6 horas (Rabbani and Thornalley, 2015).

O MG em níveis fisiológicos (μM), age como um agonista parcial dos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA) do tipo A (GABA_AR), possuindo 1/3 da força de ativação de seu neurotransmissor clássico (Distler et al., 2012). Os receptores GABA_A são membros de uma superfamília de canais iônicos ativados por ligantes, de estrutura pentamérica, permeável a cloreto (Cl^-) (Bormann, 2000; Chebib and Johnston, 2000). Esse aumento a permeabilidade ao íon aumenta a resposta sináptica inibitória à liberação pré-sináptica do principal ligante endógeno do receptor, o neurotransmissor GABA (Johnston, 2005; Scott and Aricescu, 2019). Efeitos inibitórios sobre a neurotransmissão diminuem a probabilidade da geração de um potencial de ação, devido a hiperpolarização pós-sináptica (Kullmann et al., 2005). O efeito do MG na ativação dos receptores GABA_A se dá de forma parácrina, após se difundir pela membrana plasmática quando gerado intracelularmente por neurônios e pela glia (Nusser et al., 1999), uma vez que na fenda sináptica a concentração de GABA é centenas de vezes maior que a de MG. Em estudos

in vitro, alterações na concentração do MG ocasionaram bruscas mudanças no potencial e corrente da membrana celular neuronal, o que substancialmente alterou o comportamento (Distler et al., 2012).

Devido à alta reatividade apresentada pela molécula do MG, mimetizar os efeitos e manter os níveis desse composto em estudos, visando a concentrações patológicas ou fisiológicas é um grande desafio. Dessa forma, são encontrados na literatura inúmeros estudos que diferem na concentração do composto, nas vias de avaliação e os tempos de tratamento realizados, tanto *in vitro* (majoritariamente avaliados) quanto *in vivo*. Foi demonstrado que a citotoxicidade causada pelo MG é mediada pelo enfraquecimento do sistema de detoxificação e morte celular (Di Loreto et al., 2004, 2008). O MG induziu a morte das células progenitoras de neurogênese no hipocampo adulto de camundongos (Chun et al., 2016), bem como em diferentes linhagens celulares, cultura de neurônios e astrócitos e fatias de córtex, sobretudo em curtos intervalos de tempo (1h – 24h) (Chu et al., 2014; Hansen et al., 2017; Heimfarth et al., 2013). Em estudos com eletrofisiologia, foram avaliadas as concentrações de 0,01 a 100 μ M de MG, respectivamente em culturas de neurônios do hipocampo e do cerebelo (Distler et al., 2012), e fatias cerebrais de camundongos (10 μ M) (Hambusch et al., 2010). Outras vias como a administração intraperitoneal também foram avaliadas, na qual doses entre 50 – 300mg/kg de peso corporal para ratos ou camundongos (Distler et al., 2012, 2013; Nigro et al., 2014), administração oral (600mg/kg de peso corpóreo) e administração intracerebroventricular (ICV), com injeções repetidas e únicas aplicadas em ratos (3 μ M/ μ L) (Hansen et al., 2016a).

A produção de MG é acelerada em condições de hiperglicemia (Lee et al., 2009; Turk, 2010), por prejuízo na utilização da glicose e deficiência da enzima triose-fosfato isomerase (Ahmed et al., 2003). Dependendo do controle glicêmico, as concentrações

plasmáticas do MG e AGEs podem aumentar de 2-4 vezes em pacientes diabéticos (Lapolla et al., 2003; Rabbani and Thornalley, 2014b). Na DA, as concentrações de MG no LCR aumentaram até 2 vezes mais quando comparados com pacientes sem a doença (Kuhla et al., 2005) bem como o aumento do aduto MG-H1 (Ahmed et al., 2005c).

1.6 MG – Um biomarcador para Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, caracterizada por aumento nos níveis de glicose sanguínea (Zaccardi et al., 2016), classificada como diabetes tipo 1 (DM1) e diabetes tipo 2 (DM2), sendo a última a mais comum de todos os tipos de diabetes, abrangendo aproximadamente 90% de todos os casos (Koye et al., 2018; Zimmet et al., 2014). O DM1 é caracterizado pela falta de produção de insulina pelas células β -pancreáticas enquanto que o DM2, relacionado com a deficiência e/ou resistência à insulina dessas células (American Diabetes Association, 2020; Zarkogianni et al., 2015). A hiperglicemia crônica e a resistência à insulina são comumente associadas ao desenvolvimento de complicações vasculares, as quais levam a alterações em órgãos como os rins (nefropatia), retina (retinopatia) e nervos periféricos (neuropatia) (Donaghue et al., 2009).

Existem consideráveis evidências científicas que o significativo aumento dos níveis de MG celular pela hiperglicemia contribuiria para o desenvolvimento dessas micro e macro complicações e outros fatores de risco como hipertensão, dislipidemia e obesidade (Schalkwijk and Stehouwer, 2020). Além disso, o MG contribui com a neuropatia diabética, já que modula a atividade de proteínas como o canal iônico de sódio dependente de voltagem, vinculado à hiperalgesia, Nav1.8, bem como age sobre o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) (Andersson et al., 2013; Bierhaus et al., 2012). Além disso, o MG acarretaria a predisposição a DM2 (Moraru et al., 2018), uma vez que

induz a resistência à insulina (Mey and Haus, 2018), desde que modifica estrutural e funcionalmente a molécula (Jia et al., 2006; Schalkwijk et al., 2008). Estudos anteriores demonstraram que o MG inibe a via do substrato da insulina (IRS)-1 e fosfoinositídeo 3-quinase (PI₃K), prejudicando a sinalização desempenhada pela molécula (Matafome et al., 2017; Nigro et al., 2014; Riboulet-Chavey et al., 2006). Dessa forma, o MG ocasiona uma diminuição na secreção da insulina sobretudo porque interage com as células β -pancreáticas e células endoteliais causando disfunções celulares (Bo et al., 2016; Fiory et al., 2011; Vulesevic et al., 2016) e geração de espécies reativas de oxigênio (Pi et al., 2007). Somado a isso, altos níveis de MG plasmáticos acarretaram um maior risco para diminuição na filtração renal (do inglês, eGFR) e albuminúria em pacientes DM1 e DM2 (Hanssen et al., 2017, 2018; Jensen et al., 2016) e, somado a isso, é sabido que praticamente todas as estruturas renais são susceptíveis ao acúmulo dos AGEs e assim, não apenas o efeito do MG *per se*, mas também, AGEs derivados como MG-H1 e CEL são indicadores precoces na progressão de lesões na nefropatia diabética (Beisswenger and Miller, 2013).

1.7 Relação entre o DM e o SNC

Ao lado das alterações ocasionadas em órgãos periféricos pela hiperglicemia, pacientes diabéticos também apresentam anormalidades estruturais e funcionais no SNC (Salas and De Strooper, 2019). Estudos sugeriram que pacientes diabéticos (DM1 e DM2) apresentaram declínio cognitivo (Cukierman et al., 2005; Kodl and Seaquist, 2008), principalmente associados a processos de aprendizagem e memória (Ryan, 1988). Além disso, foi proposto que o diabetes aumenta o risco no desenvolvimento de demência e especialmente demência do tipo Alzheimer (50-100% de incidência independentemente da origem étnica) (Baglietto-Vargas et al., 2016; Biessels and Despa, 2018), sobretudo

no DM2 (Biessels et al., 2006; Pugazhenthii et al., 2017; Tumminia et al., 2018). Abrangentes evidências mostram que no percurso inicial da DA, há um prejuízo na sinalização realizada pela insulina (de la Monte and Wands, 2005) e o conseqüente déficit na utilização da glicose (Mosconi et al., 2008, 2009), o que contribuiria para a progressão aos distúrbios na cognição (Dhamoon et al., 2009; Hoyer et al., 1991), e o desbalanço no metabolismo energético e na homeostase cerebral (Grünblatt et al., 2007; de la Monte, 2012; de la Monte and Wands, 2005; de la Monte et al., 2009). Modelos clínicos e experimentais de diabetes tem apresentado que a intolerância à glicose é associada a todas as causas de demência (Ohara, 2013) e aumento do risco quando comparado a indivíduos não-diabéticos (Cukierman et al., 2005; Sommerfield et al., 2004; Spauwen et al., 2013). Indivíduos DM2 com níveis aumentados de hemoglobina glicada apresentaram baixos *scores* para a aprendizagem e memória (Cukierman-Yaffe et al., 2009). Em virtude de todas essas similaridades características com o diabetes, a DA pode ser denominada como “diabetes tipo 3” ou “DM2 específica do encéfalo” (Sebastião et al., 2014; Steen et al., 2005).

Além da hiperglicemia, diversos outros fatores também têm sido sugeridos e estudados como mediadores entre o diabetes e a demência, entre eles, o acúmulo de AGEs (Bornstein et al., 2014; Strachan et al., 2011; Yang and Song, 2013). Embora esteja claro que a DA e o diabetes compartilham um número de processos moleculares e mediadores que fundamentam a degeneração das respectivas desordens, os mecanismos envolvidos ainda não são exatamente claros. Dessa forma, já que o número de indivíduos com diabetes, prevalentemente DM2 continua a aumentar, e a população continua a envelhecer, é de grande importância aprofundar o conhecimento dessa sinergia entre DM, comprometimento cognitivo, idade e a DA.

1.8 MG, Diabetes e SNC

Nos últimos anos tem se aprofundado sobre os estudos da importância da regulação dos níveis de MG no SNC (Allaman et al., 2015; Angeloni et al., 2014; Distler et al., 2012; Kuhla et al., 2006, 2007). Elevados níveis séricos de MG (Beeri, 2011) e elevadas concentrações plasmáticas de AGEs derivados de alimentos (Cai et al., 2014; West, 2014), têm sido associados com um rápido declínio cognitivo em indivíduos idosos não dementes e camundongos. Outro estudo, conduzido por Srikanth e colegas, (Srikanth et al., 2013), avaliando pessoas idosas, demonstrou que níveis elevados de MG estavam associados com um decréscimo na memória, menor função executiva, e atrofia encefálica, caracterizada por um menor volume de matéria cinzenta dos idosos. Entre vários outros fatores, uma das explicações poderia estar relacionada com o decréscimo na atividade da Glo1 observado no cérebro de pessoas idosas quando comparado com indivíduos jovens (Kuhla et al., 2006). Esse prejuízo no metabolismo da Glo1 e consequente aumento nos níveis de MG séricos e no LCR tem sido associado também ao declínio cognitivo apresentado pelos pacientes com a DA quando comparado com indivíduos controles (Angeloni et al., 2014; Beeri, 2011; Chen et al.; Srikanth et al., 2013).

Em modelos experimentais de diabetes, os altos níveis de MG também estariam associados com prejuízos na aprendizagem e memória (Huang et al., 2012; Wartchow et al., 2020). A supressão dos efeitos do acréscimo nos níveis de MG pelo polifenol mangiferina preveniu o declínio cognitivo apresentado em ratos (Liu et al., 2013), e o uso de metformina no tratamento de diabéticos principalmente DM2, tem reduzido significativamente o MG plasmático acompanhada por um significativo aumento na atividade da Glo1 (Beisswenger et al., 1999; Kender et al., 2014). Um aumento nos níveis da Glo1 diminui significativamente os níveis de MG e AGEs no plasma de ratos diabéticos (Brouwers et al., 2011), bem como causou um decréscimo nos níveis de RAGE

e AGEs no hipocampo, com consequente melhora no dano cognitivo induzido pelo MG (Liu et al., 2013). Em adição a isso, a quantidade da proteína bem como o RNAm para Glo1 foi encontrada diminuída em vários órgãos, incluindo o cérebro, fígado e rins de ratos Nrf2^{-/-}, com um aumento de 100% nos níveis de MG e de seus adutos na urina (Xue et al., 2012).

Por outro lado, a regulação da expressão da Glo1 pelo MG tem sido relacionada a ansiedade (Distler et al., 2012; Hovatta et al., 2005; Kromer, 2005; Williams et al., 2009). Em roedores, o MG a curto prazo, tem sido reportado por apresentar efeitos ansiolíticos (Distler et al., 2012; Szczepanik et al., 2020) e doses diárias dessa molécula tem reduzido o comportamento do tipo-ansioso (Hambusch et al., 2010), com concomitante diminuição na atividade do receptor GABA_A (Distler et al., 2012).

Os prejuízos cognitivos podem ser justificados pelo efeito do MG no hipocampo, já que esta estrutura cerebral é muito vulnerável à citotoxicidade celular ocasionada pelo composto (Kuhla et al., 2005; Schalkwijk and Stehouwer, 2020). Roedores submetidos a elevadas concentrações de MG, apresentaram déficit cognitivo em diferentes tipos de memória e em breves períodos de tempo (Hansen et al., 2016a; Lissner et al., 2021; Szczepanik et al., 2020). Na presença de MG, culturas neuronais de hipocampo apresentaram significativo aumento nos processos de apoptose celular com uma expressão aumentada na atividade de enzimas como a caspase-3 e Bax (Di Loreto et al., 2008; Heimfarth et al., 2013; Tajés, 2014), um descontrole no status oxidativo neuronal e depleção no conteúdo do GSH (Cai et al., 2002; Ighodaro, 2018), bem como aumento nos níveis dos marcadores inflamatórios (Vlassara et al., 2002; Weisman et al., 2006).

Além disso, foi proposto que a glicação acelera os processos de polimerização do β-amiloide (Aβ) e da hiperfosforilação da proteína tau, os quais são marcadores histopatológicos na DA (Li et al., 2012, 2013; Shuster et al., 2020). Na glicação do

peptídeo A β pelo MG, são geradas formas oligoméricas maiores contendo folhas- β (Li et al., 2013) e a formação de AGEs acelera a transição do peptídeo β -amilóide monomérico para sua forma oligomérica e, em seguida, gerando agregados ainda maiores (Taghavi et al., 2017). A toxicidade apresentada pelo peptídeo β -amilóide modificado pelo MG diminuiu a viabilidade celular (Angeloni et al., 2014). Estudos verificaram um acúmulo dos AGEs intra- e extracelularmente no cérebro durante o envelhecimento e na DA (Grillo and Colombatto, 2008; Münch et al., 2003). Nos pacientes com a DA, adutos de AGEs foram encontrados aumentados em 3 vezes em placas senis, quando comparados com controles pareados por idade (Vitek et al., 1994). Foi observado também uma colocalização com as placas e emaranhados neurofibrilares (Grillo and Colombatto, 2008; Muronetz et al., 2017) e um acúmulo dos produtos de Amadori nas principais proteínas presentes no LCR, incluindo a albumina (Shuvaev et al., 2001).

Conforme o exposto acima e segundo estudos prévios, e mesmo considerando que ainda existem várias perguntas inconclusivas e muitos estudos a serem realizados, o papel da desregulação nos níveis de MG fisiológicos são apontados como um dos principais mediadores nas complicações associadas à DA e diabetes (Krautwald and Münch, 2010; West, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração ICV de MG sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

I. Avaliar os efeitos comportamentais de MG (ICV) após 12, 36 e 60 horas em ratos Wistar:

- Atividade locomotora: campo aberto;
- Comportamento do tipo ansioso: labirinto em cruz elevado;
- Aprendizagem: habituação no campo aberto;
- Memória de reconhecimento: teste de reconhecimento de objetos;
- Memória espacial: teste do Y-maze.

II. Avaliar o efeito do MG sobre a função astrogliar 72 h após a administração ICV:

- Na atividade da enzima glutamina sintetase (GS) e glioxalase 1 (Glo1) e conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo;
- No conteúdo dos transportadores de glutamato (GLAST e GLT-1), receptor de glutamato NMDA (subunidade GLUN1) e Glo1 no hipocampo;
- No conteúdo da proteína ligante de cálcio S100B (no hipocampo, LCR e soro) e na expressão gênica (RNAm, no hipocampo);
- No conteúdo da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) hipocampal;
- Na expressão gênica (RNAm) da citocina interleucina 1 β (IL-1 β) hipocampal.

III. Avaliar o efeito do MG em possíveis alterações na BHE, particularmente sobre as funções astrocíticas 72 h após a sua administração ICV:

- No conteúdo de albumina (LCR/soro);
- Na permeabilidade da BHE através do corante Evans blue;
- No conteúdo das proteínas aquaporina 4 (AQP-4), Conexina-43 (Cx43) e receptor de produtos de glicação avançada (RAGE) no hipocampo;
- Na expressão gênica (RNAm) da proteína (High mobility group Box-1) (HMGB1), fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), fator nuclear kB (NfκB), e Heme oxigenase (HO)-1 hipocámpais.

PARTE III

5 DISCUSSÃO

Conforme dados de órgãos mundiais da saúde, há um estimado aumento da prevalência em escala global, de DM e doenças neurodegenerativas como a DA nos próximos anos (Alzheimer's Association, 2016; American Diabetes Association, 2020). Embora muitos grupos de pesquisa têm aprofundados os estudos acerca dos processos envolvidos na etiologia e patogenia dessas desordens, um total entendimento ainda não é completamente elucidado. Nos últimos anos, abrangentes evidências, baseadas em estudos clínicos e experimentais indicam que disfunções no metabolismo da glicose e gerações de intermediários metabólicos reativos como o MG contribuem para as complicações metabólicas observadas em pacientes diabéticos e, às disfunções cerebrais observadas em doenças neurodegenerativas como a DA (Schalkwijk and Stehouwer, 2020; Yang and Song, 2013). Além disso, tem sido extensivamente estudado a relação entre hiperglicemia no DM não-tratado e a incidência de demência, principalmente demência do tipo Alzheimer (Biessels and Despa, 2018; Kopf and Frölich, 2009). Estudos anteriores têm demonstrado também que, em condições de hiperglicemia, o MG induz a disfunções microvasculares de células endoteliais da BHE (Hussain, 2016; Irshad et al., 2019; Li, 2013), reduzindo a integridade e permeabilidade celular (Tóth et al., 2014b, 2014a). Dessa forma, podemos afirmar que o MG *per se* ou mediando glicação pode ser, ao menos em parte, responsável pelo rápido declínio cognitivo, bem como às exacerbadas respostas celulares geradas, como o estresse oxidativo celular e ativação de processos inflamatórios (Angeloni et al., 2014; Di Loreto et al., 2004, 2008; Kuhla et al., 2005; Liu et al., 2013; Rabbani and Thornalley, 2008; Sena et al., 2012).

O SNC, devido à alta demanda energética proveniente da glicose, apresenta uma maior susceptibilidade a toxicidade induzida pelo MG, colocando sobretudo os astrócitos, como o alvo principal devido ao papel na neuroproteção neuroglial, representado pelo

alto metabolismo no sistema de enzimas glioxalases (responsáveis pela detoxificação celular do MG) (Allaman et al., 2015; Bélanger et al., 2011).

Na presente tese, foram obtidos diversos resultados gerando dois artigos científicos. Os resultados foram apresentados em dois capítulos, ambos estudando como altas concentrações de MG a curto prazo, induzem alterações comportamentais e astrogliais (Capítulo 1), e como parâmetros gliais relacionados a funcionalidade da BHE estariam sendo modulados (Capítulo 2) em ratos Wistar machos adultos. A discussão referente a esses achados, segue abaixo.

Avaliação dos efeitos do MG em parâmetros comportamentais 12, 36 e 60 horas após a administração ICV

Para a realização deste estudo, o MG foi administrado ICV na concentração de $3\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ em três diferentes grupos: Naive (ratos não submetidos ao procedimento cirúrgico), SHAM-operados e grupo MG. Após diferentes intervalos de tempo (12, 36 e 60 horas) tarefas de comportamento, relacionados a aprendizagem e memória, e a ansiedade bem como a atividade locomotora foram avaliados.

Doze horas após a cirurgia, a atividade locomotora e o comportamento do tipo-ansioso foram avaliados no teste do campo aberto e EPM, respectivamente. A performance cognitiva, tanto para a memória de reconhecimento quanto para a memória espacial, foi avaliada 36h após administração do MG.

A hipótese do nosso trabalho se baseia na busca pelo melhor entendimento de achados de estudos anteriores do nosso grupo, no qual Hansen et al (Hansen et al., 2016a) observou que a administração ICV de MG modularia comportamentos relacionados a ansiedade e processos de aprendizagem e memória em ratos, a longo prazo (quatro semanas). Embora os níveis de MG usados no estudo sejam muito maiores do que aqueles apresentados em complicações diabéticas, nós propormos reproduzir como esse aumento preponderante de MG endogenamente formado no encéfalo, inferiria em alterações comportamentais, abrangendo a ansiedade e processos da aprendizagem e memória, a curto prazo, e translacioná-lo aos efeitos, de forma crônica. Adicionado a isso, embora existam na literatura vários estudos buscando entender o envolvimento do MG nas complicações do DM e em doenças neurodegenerativas, a maioria dos estudos sobre o efeito do MG, a curto prazo, não são *in vivo*.

Além disso, nossa hipótese é respaldada por evidências indicando que o acúmulo de MG, comum na idade e em pacientes diabéticos têm sido relacionados com um rápido

declínio cognitivo, o qual contribui para déficits no processamento de informações e atenção e aumento da atrofia encefálica em idosos não-dementes (Di Loreto et al., 2008; Srikanth et al., 2013; West, 2014). O aumento de AGEs circulantes provenientes da dieta também estão associados ao declínio cognitivo apresentado em modelos experimentais e clínicos (Cai et al., 2014; West et al., 2014).

Em relação a performance cognitiva, duas diferentes tarefas para a avaliação da aprendizagem e memória foram realizadas. Primeiramente, no teste de reconhecimento de objetos, nós observamos que os ratos tratados com o MG apresentaram déficits cognitivos em memórias de curta e longa duração, consistentes com o prejuízo na memória espacial de curto prazo avaliada no teste do Y-maze. Embora haja poucos estudos na literatura que avaliam o efeito cognitivos do MG, nossos achados são respaldados por estudos anteriores que sugerem que o MG induz a déficits cognitivos em breves intervalos de tempo (3.6 horas – 11 dias) após a administração (Szczepanik et al., 2020), e que um aumento nos níveis de MG pode ser indicativo de lesão das células cerebrais iniciada antes do comprometimento cognitivo ser clinicamente evidente (Beeri, 2011). Dessa forma, é possível inferir que a elevação nos níveis de MG no encéfalo, afetaria já em curto intervalo de tempo processos de aprendizagem e memória e sendo assim, a susceptibilidade hipocampal à citotoxicidade do composto. Estudos anteriores têm demonstrado que o MG, *in vitro*, causou diminuição da neurogênese bem como o enfraquecimento da capacidade de detoxificação e morte celular apoptótica nos neurônios hipocampais de ratos (Chun et al., 2016; Di Loreto et al., 2004, 2008). Neste trabalho, embora não avaliado a formação de AGEs, é sabido que o MG se liga irreversivelmente a proteínas plasmáticas em 3,6 horas (Rabbani and Thornalley, 2015) o qual reforçaria nossa hipótese que o MG *per se*, ou mediando processos de glicação estaria envolvido nos prejuízos apresentados nos processos cognitivos.

Em adição, nossos resultados indicaram que a infusão aguda do MG foi capaz de gerar comportamento ansiolítico nos ratos (avaliados pelo *Plus maze*), representado pelo aumento da permanência nos braços abertos do aparato. Isso sugere a importância na modulação dos níveis do MG no SNC, já que em concentrações fisiológicas o composto age como um agonista parcial de receptores GABA_A (do inglês, GABA_AR) (Distler et al., 2012; McMurray, 2016). A observação do efeito ansiolítico em ratos induzidos pelo MG, a curto prazo, anteriormente já tem sido reportada (Distler et al., 2012; Szczepanik et al., 2020) bem como a redução no comportamento do tipo ansioso através injeções diárias de MG (Hambusch et al., 2010). Concomitantemente, nós observamos que no grupo MG, os ratos apresentaram um decréscimo na atividade locomotora medida 12 horas após a administração ICV, no campo aberto. Isto está de acordo com estudos na literatura que demonstraram que a ativação de GABA_AR é caracterizado por efeitos agudos como decréscimo na atividade locomotora, ataxia e hipotermia (Distler et al., 2012). Embora nós não avaliamos pontualmente o efeito do MG na atividade locomotora nas diferentes tarefas comportamentais usadas nesse trabalho, e nos demais intervalos de tempo, vale ressaltar aqui que esse prejuízo locomotor não foi capaz de afetar os níveis de exploração importantes para a avaliação da memória, na fase treino do NOR, 36 horas após a administração do MG, já que os índices de exploração do grupo MG, durante a fase treino foram satisfatórios. Somado a isso, como nós avaliamos o efeito do MG em um pequeno intervalo de tempo, foi adicionado um grupo Naive para excluir o viés da cirurgia nos testes comportamentais. Esses achados fortalecem a ideia de que altas concentrações de MG são capazes de induzir a ativação de GABA_AR, representada pela alta sinalização inibitória, o que por sua vez, pode influenciar diferentes efeitos fisiológicos e comportamentais (Chua and Chebib, 2017).

Avaliação dos efeitos do MG na BHE e sobre a função neuroglial, 72 horas após a administração ICV

Nessa tese nós analisamos parâmetros gliais 72 horas após a administração do MG e investigamos, sobretudo se a funcionalidade da BHE estaria alterada nesse modelo de injúria aguda ao MG.

Observamos que a concentração de MG ($3\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) foi capaz de diminuir a captação de glutamato nas fatias de hipocampo. Esse decréscimo não foi acompanhado por mudanças na quantidade dos transportadores, GLAST e GLT-1, o qual está de acordo com achados indicando que não há diferenças nos níveis dos transportadores em um modelo de DM (Coleman et al., 2004). Portanto, nossos resultados sugerem que o MG modularia essas mudanças através da glicação. O comprometimento da captação de glutamato, aumentaria os níveis do neurotransmissor na fenda sináptica e desse modo, geraria disfunção glutamatérgica. Um estudo anterior do nosso grupo, Hansen, 2017 (Hansen et al., 2017), culturas de astrócitos incubadas com MG e Aminoguanidina (AG), um potente agente anti-glicante, demonstrou uma reversão na captação de glutamato. Outro estudo também demonstrou que o MG foi capaz de diminuir a captação de glutamato através da inativação do transportador de glutamato GLT-1, atribuído a formação do aduto GLT-1 – CML (Kawaguchi et al., 2005). A seguir, nós avaliamos se o MG induziu a mudanças no conteúdo hipocampal do GLUN1, uma subunidade do receptor de glutamato, NMDA, comumente envolvida na excitotoxicidade glutamatérgica. Nenhuma mudança foi observada, porém esta ausência não exclui a possibilidade de relação com a excitotoxicidade causada pela reduzida captação de glutamato astrogliar. Estudos anteriores têm apontado uma ativação do receptor após o tratamento com o MG (Garcia de Arriba et al., 2006), alterações na transmissão glutamatérgica em receptores de glutamato em modelo experimental de diabetes (Gardoni et al., 2002). A

excitotoxicidade pode ser reforçada também pelo aumento nos níveis de glutamato no LCR. Neste trabalho, embora esse aumento não foi confirmado, nós não excluímos a possibilidade de excitotoxicidade, já que os níveis de glutamato no LCR não refletem necessariamente os níveis extracelulares desse neurotransmissor no hipocampo.

Para prevenir excitotoxicidade após a neurotransmissão, o glutamato é rapidamente removido da fenda sináptica e transformado em glutamina pela enzima específica de astrócitos, a glutamina sintetase (GS), e posteriormente liberada para o meio extracelular e captada pelos neurônios para a síntese de glutamato novamente (Bak et al., 2006). O decréscimo na atividade da GS está relacionado ao prejuízo no ciclo glutamato-glutamina e conseqüentemente, na neurotransmissão glutamatérgica (Coulter and Eid, 2012; Rose et al., 2013). Importaneamente, nós observamos um decréscimo na atividade da GS. Esses resultados permitem esclarecer que elevados níveis de MG afetam a função astrogliar e conseqüentemente, alterações na sinalização glutamatérgica. Todos esses achados contribuem inclusive para a base da explicação dos déficits cognitivos observado nos ratos tratados com o MG, já que o glutamato é um importante neurotransmissor na sinalização de vários processos, incluindo o processo de aprendizagem e memória.

Como já mencionado nessa tese, o sistema glioxalase (composto pela Glo1 e Glo2) é o principal sistema de detoxificação na prevenção do estresse dicarbonílico induzido pelo MG, o qual é dependente da glutathiona reduzida como cofator (GSH) (Rabbani and Thornalley, 2014b). No presente estudo, o grupo MG apresentou um decréscimo no conteúdo da GSH, sem alterações na atividade e conteúdo da Glo1. Estudos anteriores observaram um aumento da atividade da Glo1 após 24 horas de exposição ao MG (Hansen et al., 2012, 2017). Contudo, aqui, nós medimos apenas o efeito do insulto ao MG, 72 horas após a administração, e não descartamos a possibilidade de um rápido e transiente incremento da Glo1. A GSH é um importante antioxidante

endógeno, principalmente produzido e reciclado pelos astrócitos (Dringen, 2000), decréscimos nos níveis dessa molécula indicam disfunção astrocitária. GSH é exportado pelos astrócitos para manter os níveis de GSH nos neurônios. Além disso, a GSH extracelular pode agir com um neuromodulador no sistema glutamatérgico. A ação do MG (além da glicação e o efeito em receptores GABA e outros moduladores sinápticos como a GSH), aqui descritos, podem estar relacionados a um aumento na formação de moléculas como D-Lactato, contribuindo assim para alterações na neurotransmissão glutamatérgica, GABAérgica e sobretudo dopaminérgica (Gonçalves, 2019), os quais também podem contribuir também na explicação do porquê ratos tratados com MG apresentam déficits em processos relacionados a memória e aprendizado.

Recentes estudos têm sugerido o vasto e crítico papel da Glo1 no comportamento, principalmente no que se refere a regulação nos níveis celulares de MG (Distler et al., 2012; Hamsch et al., 2010). Em modelos experimentais, muitas evidências tem associado a expressão da Glo1 a ansiedade (Benton et al., 2012; Distler and Palmer, 2012; Reiner-Benaim et al., 2007), na qual a sobreexpressão do gene da Glo1 aumentaria o comportamento do tipo ansioso em ratos devido à redução no conteúdo de MG ((Distler et al., 2012; Hovatta et al., 2005; McMurray, 2016). Além disso, foi reportado que polimorfismos ao gene da Glo1 estariam envolvidos em outras desordens psiquiátricas como a depressão, autismo, esquizofrenia e dores neuropáticas (Benton et al., 2012; Bierhaus et al., 2012; Loos et al., 2009).

Como parte desse trabalho, foi avaliado também o efeito do MG na função astrocitária, representada pela expressão e conteúdo da S100B e GFAP. Na DA e outras doenças neurodegenerativas, o prejuízo na função e atividade astrogliar ocorre mesmo antes dos sinais patológicos e clínicos da doença (Fakhoury, 2018; Fuller et al., 2010). A S100B é uma proteína ligante de cálcio, encontrada em altos níveis no SNC, expressa e

secretada majoritariamente por astrócitos no SNC (Gonçalves, 2008) e periféricamente pelo tecido adiposo (Haimoto et al., 1987; Michetti et al., 1983). No SNC, a S100B está localizada em grande parte nas células da glia e pode atuar como fator neurotrófico ou como uma citocina inflamatória por meio de sua ligação com o RAGE (Donato et al., 2009). Níveis extracelulares elevados têm sido reconhecidos como marcadores da ativação glial em resposta a injúrias no SNC (Steiner et al., 2007). Aqui, nós observamos um aumento do conteúdo da S100B no LCR, o qual não foi acompanhado por alterações no soro, confirmando com estudos anteriores na qual essa não correlação também foi observada (Guerra et al., 2011). É sabido que níveis elevados de S100B no LCR são respostas a condições agudas de injúria neuronal (Guerra et al., 2011; dos Santos et al., 2017), e observados em estágios iniciais da DA (Peskind et al., 2001). Aqui, um decréscimo nos níveis de RNAm hipocampal da S100B foram também observados sem uma correspondente diminuição no conteúdo da S100B, mas entende-se que alterações gênicas para a S100B não necessariamente acompanham mudanças no conteúdo proteico (Zimmer et al., 1997). Nós medimos os parâmetros relacionados a expressão gênica e da proteína S100B apenas 72 horas após a administração do MG, e talvez, caso avaliássemos outros intervalos de tempo poderiam nos fazer entender melhor tais variações. Somado ao aumento da S100B extracelular, nós um aumento nos níveis de RNAm da IL-1 β . Níveis extracelulares elevados da S100B se apresentam como citocinas neurotróficas e mais recentemente, consideradas como alarminas (Bianchi, 2007; Xu et al., 2016). A secreção da S100B é seguida pela liberação de citocinas primárias como a IL-1 β e, sobretudo, é modulada por estas (de Souza et al., 2009, 2013).

A exacerbada resposta do RAGE tem sido implicada em muitas doenças neurodegenerativas. A ativação desse receptor pode ser realizada por diferentes ligantes além da S100B, como os AGEs e a HMGB1 (MacLean et al., 2019; Sagheddu et al.,

2018). Neste trabalho, nós não observamos alterações no imunoconteúdo do receptor RAGE e na expressão gênica para a HMGB1 hipocampais. Considerando tais mudanças, portanto, é possível conceber uma alteração na comunicação S100B/RAGE neste modelo agudo, o que poderia estar ocorrendo em situações de picos hiperglicêmicos. Por outro lado, nós não observamos diferenças no conteúdo hipocampal da GFAP (medido por ELISA), e na região CA1 do hipocampo (avaliada por imunofluorescência). Elevações nos níveis de GFAP são relacionados a sinais de astrogliose, envolvidos em condições severas de injúria cerebral (Brenner, 2014; Wang et al., 2018). Embora existam poucos estudos avaliando o efeito do MG *in vivo*, a curto prazo e alterações na GFAP, nossos achados estão de acordo com outros de nossos estudos anteriores (Hansen et al., 2016a). A administração do MG tem sido acompanhada de aumento na reatividade astrocitária hipocampal (aumento nos níveis de GFAP e S100B), como reportado por Chu et al. (Chu, 2016). Porém, o protocolo seguido pelo grupo do Chu avaliou o efeito crônico do MG seis semanas após a administração (doses diárias, i.p.), o que poderia ser a explicação na divergência para os resultados aqui expostos. Diferenças metodológicas nos modelos animais, heterogeneidade das células gliais, tempo das análises e ensaios para a medida de GFAP podem caracterizar as discrepâncias nos resultados em estudos experimentais e clínicos para a DM vistos na literatura (Amin et al., 2013; El-Akabawy and El-Kholy, 2014; de Senna et al., 2011). Também é importante enfatizarmos que, embora a GFAP seja o marcador mais comum de astrogliose, a ativação astrogliar não necessariamente envolve aumento no conteúdo desta proteína, já que as células astrocitárias podem estar com sua morfologia alterada e não ter uma maior produção de GFAP (Liberto et al., 2004). Neste estudo (Chu, 2016) foi observado também uma resposta de ativação na via de regulação a inflamação c-Jun N-terminal cinase (*JNK*), a qual pode estar relacionada a um aumento nos níveis de IL-1 β , já descrita aqui anteriormente.

O estresse oxidativo causado pelo MG, o qual pode ser observado pela depleção do GSH (Chen, 2010; Lissner et al., 2021), ativa várias vias anti- e pró-oxidantes (Di Loreto et al., 2008). Nós investigamos a expressão dos dois maiores fatores de transcrição, o Nrf2 e o fator nuclear kB (NfκB), possivelmente ativados nessa condição, bem como a Heme oxigenase -1 (HO-1).

A ativação do Nrf2 tem sido associado na modulação de enzimas responsáveis pela detoxificação celular e antioxidantes, incluindo a HO-1 (Calkins et al., 2009; Niture et al., 2014; Syapin, 2009). Desregulação na via regulatória Keap1-Nrf2-ARE é implicado em diversas doenças, incluindo a DA e estudos com ratos *knockout* para o gene do Nrf2 apresentaram uma maior propensão ao dano celular ocasionado pelo aumento do estresse oxidativo e inflamação (Ichihara et al., 2010; Jakel et al., 2007; Taki-Nakano et al., 2014; Zhao et al., 2019). Estudos anteriores tem demonstrado que o Nrf2 mediaría vias de sinalização contra a toxicidade induzida pelo MG (de Oliveira et al., 2015) e preveniria o dano causado por altas concentrações de glicose em um modelo experimental de diabetes (Choi et al., 2016; Zhao et al., 2019). Além disso, um aumento no status oxidativo celular pode contribuir na ativação do NfκB (Patel and Santani, 2009). Em nosso trabalho, nós não observamos mudanças na expressão do Nrf2 e NfκB, contudo a expressão gênica para a HO-1 foi aumentada. Nossos achados sugerem que este aumento nos níveis HO-1 poderia estar relacionado como uma resposta de proteção ao insulto agudo causado pelo MG. Esses dados confirmam a importância da HO-1 contra a toxicidade induzida pelo MG e ressalta que outras vias importantes na regulação/síntese/degradação do Nrf2 e NfκB poderiam estar envolvidos na resposta antioxidante inicial (Nitti et al., 2018).

Em resumo, os resultados que nós obtivemos demonstraram a habilidade do MG em interferir na homeostase cerebral através do prejuízo na remoção do glutamato extracelular. O efeito direto do MG causou disfunção astrocitária, o qual afeta também a sinalização neuronal e consequente a performance cognitiva. A excitotoxicidade glutamatérgica tem sido relacionada na DA e também no DM (Anderson and Swanson, 2000), representada pela perda de neurônios e elevada ativação de receptores pós sinápticos (Scott et al., 2011). Em associação com alterações na proteína S100B, estes dados reforçam o papel dos astrócitos como alvos na toxicidade induzida pelo MG.

Os astrócitos, dentre as inúmeras funções apresentadas, pode-se citar devido a sua proximidade aos vasos sanguíneos e as células endoteliais, a participação na manutenção e integridade da BHE (Abbott, 2002; Abbott et al., 2006). A BHE é uma complexa estrutura celular envolvida na regulação do transporte de específicas moléculas para a distribuição dentro do SNC, limitando a entrada de substâncias tóxicas provenientes do sangue (Engelhardt and Sorokin, 2009; Hawkins and Davis, 2005), ajuda na manutenção da demanda metabólica e homeostase cerebral (Andreone et al., 2015). Funcionalmente, a BHE é composta por uma monocamada fina de células endoteliais, que compreendem os capilares da vasculatura encefálica, as quais estão em contato com células vasculares (pericitos e células do músculo liso), os astrócitos, que cercam os capilares com os pés astrocitários; e os neurônios que inervam diretamente a microcirculação (Haddad-Tóvolli et al., 2017). Juntas, essas células formam a unidade neurovascular (Banks, 2016; Chow and Gu, 2015; Haddad-Tóvolli et al., 2017).

A BHE constitui uma permeabilidade seletiva, falta de fenestrações e atividade pinocitótica baixa (Shah et al., 2012). O transporte de moléculas através da BHE é regulado por difusão passiva e facilitada (e.g., albumina, imunoglobulinas) ou por transporte ativo (e.g., glicose) (Tumani et al., 2017). A perda da integridade da BHE

expõe o encéfalo a substâncias potencialmente danosas como, por exemplo, componentes plasmáticos, moléculas imunológicas, células, íons, aminoácidos, proteínas e outras macromoléculas que podem perturbar a homeostase encefálica e levar à disfunção e degeneração neuronal (Daneman and Prat, 2015; Obermeier et al., 2013). Além disso, a BHE é uma estrutura heterogênea e em certas regiões encefálicas está mais vulnerável ao dano oxidativo e ao desacoplamento neurovascular (VanGilder et al., 2009).

Especificamente, a estreita proximidade entre os pés astrocitários e as células endoteliais se dá através de proteínas transmembranas de ancoragem, como a Aquaporin 4 (AQP4), a qual juntamente com o canal de potássio Kir4.1, permitem um crítico controle no transporte de água para fora do parênquima cerebral por aumentar o fluxo de água transmembrana nos astrócitos e no tamponamento do potássio (Badaut et al., 2014; Niermann et al., 2001). A AQP4 é a aquaporina mais abundante no encéfalo, e um dos 13 tipos encontrados em mamíferos, que representam uma família de proteínas integrais de membranas (Vella et al., 2015). A distribuição astrocitária da AQP4 pode diferir significativamente nas estruturas cerebrais, apresentando-se no hipocampo, corpo caloso, cerebelo, hipotálamo e tronco cerebral (Badaut et al., 2000; Hsu et al., 2011). Essa diferença na distribuição se dá devido às múltiplas funções fisiológicas apresentadas pela AQP4, que além do controle na homeostase da água participa na migração celular, difusão de gases, solutos e substâncias potencialmente danosas ao SNC e na migração astrocitária durante a astrogliose bem como em processos de neuroinflamação (Badaut et al., 2014; Verkman et al., 2017).

Ao mesmo tempo, astrócitos formam uma rede fortemente interconectada via junções GAP (Xing et al., 2019). As junções GAP são canais especializados de comunicação entre células no SNC. Nos astrócitos, encontra-se predominantemente a conexina 43 (Cx43), abundante nos pés astrocitários circundando os vasos sanguíneos na

BHE, e em processos nos quais há o envolvimento dos astrócitos circundando as sinapses (Chew et al., 2010). A Cx43 é responsável na regulação da entrada e saída de íons e metabólitos, o qual é crítico em processos de tamponamento do íon K^+ e glutamato, propagação do íon cálcio (Ca^{2+}) e na plasticidade sináptica (Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018; Li et al., 2014).

Nós demonstramos que um insulto agudo com o MG afetaria a atividade astrogliar e, considerando o envolvimento dessas células na BHE, foi decidido avaliar o efeito do MG na funcionalidade da barreira. Foi observado um indicativo de ruptura da BHE representada pela alta concentração do corante de Evans blue no encéfalo seguido por um aumento na albumina, indicada pela taxa LCR/Soro nos ratos tratados com o MG. A albumina, devido ao alto peso molecular não atravessa a BHE em condições fisiológicas (Banks, 2015; Jacob and Alexander, 2014), e mudanças no gradiente de concentração entre o LCR e o plasma indicam dano a barreira (Banks et al., 2000). Somado a isso, embora a idade contribua para a diminuição no turnover das proteínas no LCR, aumentadas taxas de albumina no LCR/soro podem ser relacionados com o aumento na permeabilidade da BHE encontrada em pacientes com a DA e fatores de risco vasculares (Chen, 2011; Silverberg et al., 2001; Yamazaki and Kanekiyo, 2017). Estudos anteriores têm demonstrado um aumento na permeabilidade da BHE quando células endoteliais passaram por longas incubações com altas concentrações de MG (Hussain, 2016). Também foi observado mudanças morfológicas de proteínas *tight junctions* incubadas com o composto (Hussain, 2016; Li, 2013), mediados por processos de glicação (Kim et al., 2020; Tóth et al., 2014a).

As células endoteliais são envoltas por uma complexa estrutura de proteínas, a matriz extracelular, e, devido a essa composição, elevados níveis de agentes glicantes como o MG são prejudiciais a integridade dessas células (Hussain, 2016). O MG

modificaria os resíduos de arginina de sítios específicos formando hidroimidazolonas, o que acarretaria mudanças estruturais drásticas nas células endoteliais (McDonald et al., 2009). Embora nós não caracterizamos a glicação nas proteínas da BHE neste trabalho, podemos inferir claramente que há um comprometimento da funcionalidade da BHE causada pelo MG.

Como explanado anteriormente, foi observado níveis aumentados de S100B no LCR, mas não no soro de animais submetidos à administração ICV de MG (Lissner et al., 2021). Portanto, mesmo que haja uma perda evidente da integridade da BHE, a S100B não flui do LCR para o soro neste modelo agudo. Isso é especialmente importante considerando que o aumento sérico de S100B por muitos autores é atribuído à perda da integridade da BHE e esses dados contradizem essa ideia.

O dano a BHE pode afetar também outros membros que compõe a unidade vascular. As consequências podem gerar a desregulação no tamponamento do potássio celular, na circulação do LCR, absorção do fluido intersticial e na entrada de macromoléculas ou influxo iônico (Obermeier et al., 2013; Tumaní et al., 2017). Considerando a importância dos astrócitos para a BHE, nós investigamos se parâmetros gliais importantes para a funcionalidade da barreira estariam alterados em nosso modelo de injúria aguda ocasionada pelo MG.

Nossos resultados demonstraram que o grupo tratado com MG apresentou um decréscimo na quantidade da proteína hipocampal, Cx43. Embora existam poucos estudos avaliando o efeito do MG na Cx43, Hansen et al. (Hansen et al., 2016b) demonstrou que as junções GAP são importantes para proteger a toxicidade mediada por MG em cultura de astrócitos, e que as altas concentrações do AGE-BSA em células endoteliais aórticas reduziram expressão e quantidade da Cx43 (Wang et al., 2011). Dessa forma, nossos dados sugerem que a exposição ao MG causou um prejuízo na comunicação celular

desempenhada pela Cx43, afetando a funcionalidade da BHE e a “rede” de comunicação astrocitária no hipocampo.

Além disso, nós observamos um decréscimo no conteúdo da AQP4 hipocampal. Embora não saibamos se essas proteínas são alvos diretos na glicação mediada pelo MG, estes dados apresentam em primeira instância, um prejuízo na conectividade da BHE devido a exposição ao MG, o qual poderia comprometer a homeostase iônica e aquosa. Por outro lado, o conteúdo de sinaptofisina inalterado demonstra que a conectividade neuronal não parece estar afetada neste estágio inicial. Contudo, alterações no *clearance* do glutamato, realizado por astrócitos e um direto efeito do MG nos receptores sinápticos poderia explicar o prejuízo cognitivo e comportamental induzido pelo composto (Hansen et al., 2016a; Lissner et al., 2021; Liu et al., 2013).

No presente trabalho, foi avaliado como uma administração aguda ICV de uma alta concentração de MG poderia afetar a BHE, modular parâmetros comportamentais como processos de aprendizagem e memória, e ansiedade, bem como funções bioquímicas astrogliais. Embora mais estudos sejam necessários, todos esses achados contribuem para um melhor entendimento acerca do papel do MG nas complicações observadas no DM e em doenças neurodegenerativas. Esses dados reforçam também o papel dos astrócitos, as principais células responsáveis pelo *clearance* do MG como alvos na toxicidade induzida pelo composto e que disfunções na BHE podem contribuir para as alterações cognitivas, comportamentais e bioquímicas observadas nesses animais.

6. CONCLUSÃO

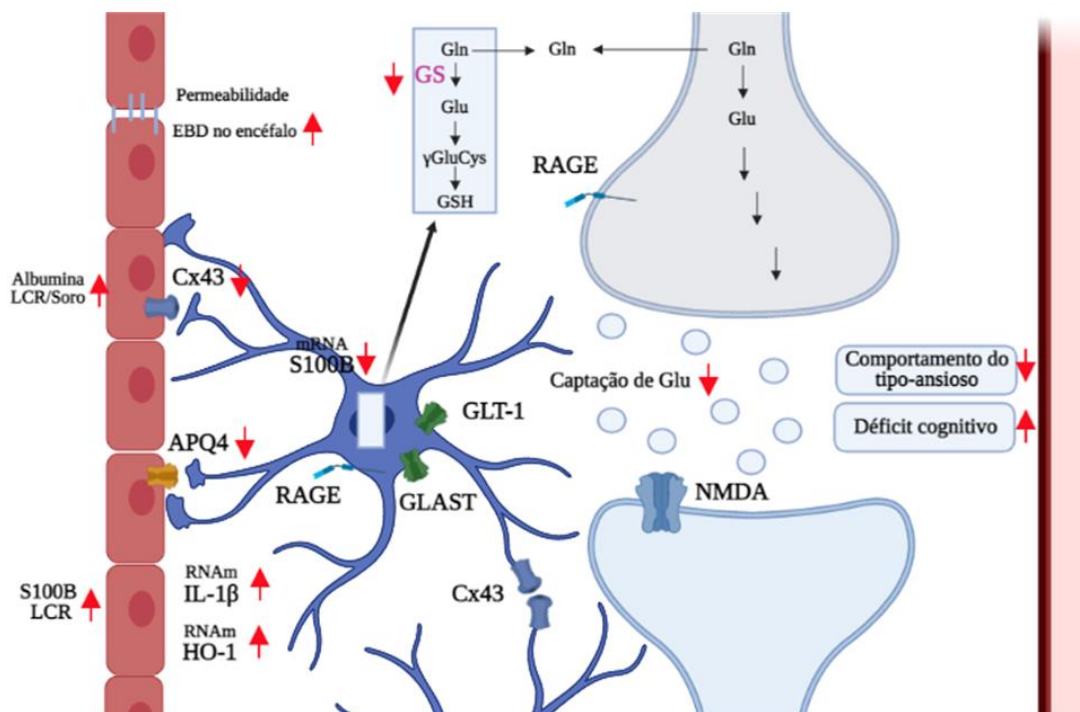


Figura 4. Representação esquemática dos principais resultados obtidos nesta tese. Para a confecção da figura foi usado o programa Biorender.

Os resultados apresentados nesta tese confirmaram claramente que altas concentrações de MG interferem diretamente na funcionalidade do SNC. Elevados níveis de MG são associados com inúmeras complicações no DM e prejudicam processos de aprendizagem e memória em diferentes estudos experimentais e clínicos. Além disso, o MG tem sido reportado por afetar a neurotransmissão, alterando neurotransmissores como o glutamato e o GABA. Aqui, o MG, *per se* ou mediando glicação, comprometeu funções astrocitárias e disfunção na BHE os quais podem contribuir nas alterações das funções cognitivas, tanto na memória de reconhecimento quanto na memória espacial, bem como uma diminuição no efeito ansioso observados em ratos tratados com o MG.

7. PERSPECTIVAS

- Aperfeiçoar as metodologias de dosagem de AGEs para tecidos cerebrais principalmente hipocampo;
- Aprofundar estudos acerca das modificações específicas de proteínas ocasionadas pelo MG, como reações de glicação, oxidação e nitração nesse modelo e *in vitro*;
- Investigar os mecanismos pelos quais o MG afetaria o sistema glutamatérgico;
- Investigar o efeito do MG em outras proteínas específicas da BHE, incluindo processos de glicação.

8. REFERÊNCIAS

- Abbott, N.J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200, 629–638.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41–53.
- Ahmed, N., Battah, S., Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Horányi, M., Baróti, K., Hollan, S., and Thornalley, P.J. (2003). Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1639, 121–132.
- Ahmed, N., Dobler, D., Dean, M., and Thornalley, P.J. (2005a). Peptide Mapping Identifies Hotspot Site of Modification in Human Serum Albumin by Methylglyoxal Involved in Ligand Binding and Esterase Activity*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 5724–5732.
- Ahmed, N., Ahmed, U., Thornalley, P.J., Hager, K., Fleischer, G., and Munch, G. (2005b). Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer’s disease and link to cognitive impairment. *Journal of Neurochemistry* 92, 255–263.
- Ahmed, N., Babaei-Jadidi, R., Howell, S.K., Beisswenger, P.J., and Thornalley, P.J. (2005c). Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* 48, 1590–1603.
- Allaman, I., BÄ©langer, M., and Magistretti, P.J. (2015). Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- Alle, H., Roth, A., and Geiger, J.R.P. (2009). Energy-Efficient Action Potentials in Hippocampal Mossy Fibers. *Science* 325, 1405–1408.
- Alzheimer’s Association (2016). 2016 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s Dement* 12, 459–509.
- American Diabetes Association (2020). 6. Glycemic Targets: *Standards of Medical Care in Diabetes—2020*. *Dia Care* 43, S66–S76.
- Amin, S.N., Younan, S.M., Youssef, M.F., Rashed, L.A., and Mohamady, I. (2013). A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Res* 2, 151.
- Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.
- Andersson, D.A., Gentry, C., Light, E., Vastani, N., Vallortigara, J., Bierhaus, A., Fleming, T., and Bevan, S. (2013). Methylglyoxal Evokes Pain by Stimulating TRPA1. *PLoS ONE* 8, e77986.
- Andreeva, A., Bekkhozhin, Z., Omertassova, N., Baizhumanov, T., Yeltay, G., Akhmetali, M., Toibazar, D., and Utepbergenov, D. (2019). The apparent deglycase

activity of DJ-1 results from the conversion of free methylglyoxal present in fast equilibrium with hemithioacetals and hemiaminals. *J Biol Chem* 294, 18863–18872.

Andreone, B.J., Lacoste, B., and Gu, C. (2015). Neuronal and vascular interactions. *Annu Rev Neurosci* 38, 25–46.

Angeloni, C., Zambonin, L., and Hrelia, S. (2014). Role of Methylglyoxal in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* 2014, 1–12.

de Arriba, S.G., Stuchbury, G., Yarin, J., Burnell, J., Loske, C., and Münch, G. (2007). Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells—protection by carbonyl scavengers. *Neurobiology of Aging* 28, 1044–1050.

Badaut, J., Nehlig, A., Verbavatz, J., Stoeckel, M., Freund-Mercier, M.J., and Lasbennes, F. (2000). Hypervascularization in the magnocellular nuclei of the rat hypothalamus: relationship with the distribution of aquaporin-4 and markers of energy metabolism. *J Neuroendocrinol* 12, 960–969.

Badaut, J., Fukuda, A.M., Jullienne, A., and Petry, K.G. (2014). Aquaporin and brain diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 1554–1565.

Baglietto-Vargas, D., Shi, J., Yaeger, D.M., Ager, R., and LaFerla, F.M. (2016). Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 64, 272–287.

Bak, L.K., Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98, 641–653.

Banks, W.A. (2015). The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain Behav Immun* 44, 1–8.

Banks, W.A. (2016). From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 15, 275–292.

Banks, W.A., Farr, S.A., and Morley, J.E. (2000). Permeability of the blood-brain barrier to albumin and insulin in the young and aged SAMP8 mouse. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55, B601-606.

Beeri, M.S. (2011). Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. *Mechanisms of Ageing and Development* 5.

Beisswenger, P.J., and Miller, M.E. (2013). Early Progression of Diabetic Nephropathy Correlates With Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products. *DIABETES CARE* 36, 6.

Beisswenger, P.J., Howell, S.K., Touchette, A.D., Lal, S., and Szweggold, B.S. (1999). Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 198–202.

Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14, 724–738.

- Belanger, M., Yang, J., Petit, J.-M., Laroche, T., Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2011). Role of the Glyoxalase System in Astrocyte-Mediated Neuroprotection. *Journal of Neuroscience* 31, 18338–18352.
- Benton, C.S., Miller, B.H., Skwerer, S., Suzuki, O., Schultz, L.E., Cameron, M.D., Marron, J.S., Pletcher, M.T., and Wiltshire, T. (2012). Evaluating genetic markers and neurobiochemical analytes for fluoxetine response using a panel of mouse inbred strains. *Psychopharmacology* 221, 297–315.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* 81, 1–5.
- Bierhaus, A., Fleming, T., Stoyanov, S., Leffler, A., Babes, A., Neacsu, C., Sauer, S.K., Eberhardt, M., Schnölzer, M., Lasitschka, F., et al. (2012). Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nature Medicine* 18, 926–933.
- Biessels, G.J., and Despa, F. (2018). Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* 14, 591–604.
- Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., and Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *The Lancet Neurology* 5, 64–74.
- Bittner, C.X. (2010). High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front. Neuroenerg.* 2.
- Bo, J., Xie, S., Guo, Y., Zhang, C., Guan, Y., Li, C., Lu, J., and Meng, Q.H. (2016). Methylglyoxal Impairs Insulin Secretion of Pancreatic β -Cells through Increased Production of ROS and Mitochondrial Dysfunction Mediated by Upregulation of UCP2 and MAPKs. *J Diabetes Res* 2016, 2029854.
- Bordone, M.P., Salman, M.M., Titus, H.E., Amini, E., Andersen, J.V., Chakraborti, B., Diuba, A.V., Dubouskaya, T.G., Ehrke, E., Freitas, A.E. de, et al. (2019). The energetic brain – A review from students to students. *Journal of Neurochemistry* 151, 139–165.
- Bormann, J. (2000). The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21, 16–19.
- Bornstein, N.M., Brainin, M., Guekht, A., Skoog, I., and Korczyn, A.D. (2014). Diabetes and the brain: issues and unmet needs. *Neurological Sciences* 35, 995–1001.
- Bose, T. (2013). Methylglyoxal-induced modifications of hemoglobin: Structural and functional characteristics. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 6.
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.-M., and Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur J Neurosci* 24, 1687–1694.
- Brenner, M. (2014). Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience Letters* 565, 7–13.
- Brouwers, O., Niessen, P.M., Ferreira, I., Miyata, T., Scheffer, P.G., Teerlink, T., Schrauwen, P., Brownlee, M., Stehouwer, C.D., and Schalkwijk, C.G. (2011).

Overexpression of Glyoxalase-I Reduces Hyperglycemia-induced Levels of Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Diabetic Rats. *Journal of Biological Chemistry* 286, 1374–1380.

Burdakov, D., Luckman, S.M., and Verkhratsky, A. (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, 2227–2235.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J. Neurosci.* 28, 264–278.

Cai, W., Gao, Q.-D., Zhu, L., Peppas, M., He, C., and Vlassara, H. (2002). Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med* 8, 337–346.

Cai, W., Urbarri, J., Zhu, L., Chen, X., Swamy, S., Zhao, Z., Grosjean, F., Simonaro, C., Kuchel, G.A., Schnaider-Beeri, M., et al. (2014). Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 4940–4945.

Calkins, M.J., Johnson, D.A., Townsend, J.A., Vargas, M.R., Dowell, J.A., Williamson, T.P., Kraft, A.D., Lee, J.-M., Li, J., and Johnson, J.A. (2009). The Nrf2/ARE Pathway as a Potential Therapeutic Target in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 11, 497–508.

Chan, W.-H., Wu, H.-J., and Shiao, N.-H. (2007). Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. *J Cell Biochem* 100, 1056–1069.

Chebib, M., and Johnston, G.A. (2000). GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* 43, 1427–1447.

Chen, R.-L. (2011). Is it appropriate to use albumin CSF/plasma ratio to assess blood brain barrier permeability? *Neurobiology of Aging* 32, 1338–1339.

Chen, Y.-J. (2010). Tenuigenin protects cultured hippocampal neurons against methylglyoxal-induced neurotoxicity. *European Journal of Pharmacology* 8.

Chen, F., Wollmer, M.A., Hoerndli, F., Tsolaki, M., and Papassotiropoulos, A. Role for glyoxalase I in Alzheimer's disease. *MEDICAL SCIENCES* 6.

Chew, S.S.L., Johnson, C.S., Green, C.R., and Danesh-Meyer, H.V. (2010). Role of connexin43 in central nervous system injury. *Exp Neurol* 225, 250–261.

Choeiri, C., Staines, W., and Messier, C. (2002). Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience* 111, 19–34.

Choi, E.M., Suh, K.S., Kim, Y.J., Hong, S.M., Park, S.Y., and Chon, S. (2016). Glabridin Alleviates the Toxic Effects of Methylglyoxal on Osteoblastic MC3T3-E1 Cells by Increasing Expression of the Glyoxalase System and Nrf2/HO-1 Signaling and Protecting Mitochondrial Function. *J. Agric. Food Chem.* 64, 226–235.

- Chow, B.W., and Gu, C. (2015). The Molecular Constituents of the Blood–Brain Barrier. *Trends in Neurosciences* 38, 598–608.
- Chu, J.M.T. (2016). Methylglyoxal-induced neuroinflammatory response in in vitro astrocytic cultures and hippocampus of experimental animals. *Metab Brain Dis* 10.
- Chu, J.M.T., Lee, D.K.M., Wong, D.P.K., Wong, R.N.S., Yung, K.K.L., Cheng, C.H.K., and Yue, K.K.M. (2014). Ginsenosides attenuate methylglyoxal-induced impairment of insulin signaling and subsequent apoptosis in primary astrocytes. *Neuropharmacology* 85, 215–223.
- Chua, H.C., and Chebib, M. (2017). Chapter One - GABAA Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. In *Advances in Pharmacology*, D.P. Geraghty, and L.D. Rash, eds. (Academic Press), pp. 1–34.
- Chun, H.J., Lee, Y., Kim, A.H., and Lee, J. (2016). Methylglyoxal Causes Cell Death in Neural Progenitor Cells and Impairs Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neurotoxicity Research* 29, 419–431.
- Coleman, E., Judd, R., Hoe, L., Dennis, J., and Posner, P. (2004). Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia* 48, 166–178.
- Coulter, D.A., and Eid, T. (2012). Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 60, 1215–1226.
- Cukierman, T., Gerstein, H.C., and Williamson, J.D. (2005). Cognitive decline and dementia in diabetes—systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia* 48, 2460–2469.
- Cukierman-Yaffe, T., Gerstein, H.C., Williamson, J.D., Lazar, R.M., Lovato, L., Miller, M.E., Coker, L.H., Murray, A., Sullivan, M.D., Marcovina, S.M., et al. (2009). Relationship Between Baseline Glycemic Control and Cognitive Function in Individuals With Type 2 Diabetes and Other Cardiovascular Risk Factors. *Diabetes Care* 32, 221–226.
- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020412.
- Degen, J., Vogel, M., Richter, D., Hellwig, M., and Henle, T. (2013). Metabolic Transit of Dietary Methylglyoxal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 10253–10260.
- Dhamoon, M.S., Noble, J.M., and Craft, S. (2009). Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 72, 292–293; author reply 293–294.
- Di Loreto, S., Caracciolo, V., Colafarina, S., Sebastiani, P., Gasbarri, A., and Amicarelli, F. (2004). Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1 β and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells. *Brain Research* 1006, 157–167.
- Di Loreto, S., Zimmitti, V., Sebastiani, P., Cervelli, C., Falone, S., and Amicarelli, F. (2008). Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic

cell death in rat hippocampal neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40, 245–257.

Dienel, G.A. (2019). Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiol Rev* 99, 97.

Distler, M.G., and Palmer, A.A. (2012). Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. *Frontiers in Genetics* 3.

Distler, M.G., Plant, L.D., Sokoloff, G., Hawk, A.J., Aneas, I., Wuenschell, G.E., Termini, J., Meredith, S.C., Nobrega, M.A., and Palmer, A.A. (2012). Glyoxalase 1 increases anxiety by reducing GABAA receptor agonist methylglyoxal. *Journal of Clinical Investigation* 122, 2306–2315.

Distler, M.G., Gorfinkle, N., Papale, L.A., Wuenschell, G.E., Termini, J., Escayg, A., Winawer, M.R., and Palmer, A.A. (2013). Glyoxalase 1 and its substrate methylglyoxal are novel regulators of seizure susceptibility. *Epilepsia* 54, 649–657.

Dobler, D., Ahmed, N., Song, L., Eboigbodin, K.E., and Thornalley, P.J. (2006). Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. *Diabetes* 55, 1961–1969.

Donaghue, K.C., Chiarelli, F., Trotta, D., Allgrove, J., and Dahl-Jorgensen, K. (2009). Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 10 Suppl 12, 195–203.

Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1008–1022.

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62, 649–671.

Dudek, E.J., Shang, F., Valverde, P., Liu, Q., Hobbs, M., and Taylor, A. (2005). Selectivity of the ubiquitin pathway for oxidatively modified proteins: relevance to protein precipitation diseases. *FASEB J* 19, 1707–1709.

El-Akabawy, G., and El-Kholy, W. (2014). Neuroprotective effect of ginger in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann Anat* 196, 119–128.

Engelhardt, B., and Sorokin, L. (2009). The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology* 31, 497–511.

Fakhoury, M. (2018). Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropharmacol* 16, 508–518.

Fiory, F., Lombardi, A., Miele, C., Giudicelli, J., Beguinot, F., and Van Obberghen, E. (2011). Methylglyoxal impairs insulin signalling and insulin action on glucose-induced insulin secretion in the pancreatic beta cell line INS-1E. *Diabetologia* 54, 2941–2952.

- Fuller, S., Steele, M., and Münch, G. (2010). Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease—Do they neglect their neurosupportive roles? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *690*, 40–49.
- Galligan, J.J., Wepy, J.A., Streeter, M.D., Kingsley, P.J., Mitchener, M.M., Wauchope, O.R., Beavers, W.N., Rose, K.L., Wang, T., Spiegel, D.A., et al. (2018). Methylglyoxal-derived posttranslational arginine modifications are abundant histone marks. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, 9228–9233.
- Garcia de Arriba, S., Krügel, U., Regenthal, R., Vissiennon, Z., Verdaguer, E., Lewerenz, A., García-Jordá, E., Pallas, M., Camins, A., Münch, G., et al. (2006). Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* *40*, 779–790.
- Gardoni, F., Kamal, A., Bellone, C., Biessels, G.J., Ramakers, G.M.J., Cattabeni, F., Gispen, W.H., and Di Luca, M. (2002). Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats. *Journal of Neurochemistry* *80*, 438–447.
- Gonçalves, C.-A. (2019). Glycolysis-Derived Compounds From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication. *Frontiers in Neuroscience* *12*, 17.
- Gonzalez-Reyes, R.E., and Rubiano, M.G. (2018). Astrocyte's RAGE: More Than Just a Question of Mood. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* *18*, 39–48.
- Grillo, M.A., and Colombatto, S. (2008). Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids* *35*, 29–36.
- Grünblatt, E., Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Riederer, P., and Hoyer, S. (2007). Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem* *101*, 757–770.
- Guerra, M., Tortorelli, L.S., Galland, F., Da Ré, C., Negri, E., Engelke, D.S., Rodrigues, L., Leite, M.C., and Gonçalves, C.-A. (2011). Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *Journal of Neuroinflammation* *8*, 128.
- Haddad-Tóvolli, R., Dragano, N.R.V., Ramalho, A.F.S., and Velloso, L.A. (2017). Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Front Neurosci* *11*.
- Haimoto, H., Hosoda, S., and Kato, K. (1987). Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest* *57*, 489–498.
- Hambusch, B., Chen, B.-G., Brenndörfer, J., Meyer, M., Avrabos, C., Maccarrone, G., Liu, R.H., Eder, M., Turck, C.W., and Landgraf, R. (2010). Methylglyoxal-mediated anxiolysis involves increased protein modification and elevated expression of glyoxalase 1 in the brain. *Journal of Neurochemistry*.
- Hansen, F., de Souza, D.F., Silveira, S. da L., Hoefel, A.L., Fontoura, J.B., Tramontina, A.C., Bobermin, L.D., Leite, M.C., Perry, M.L.S., and Gonçalves, C.A. (2012).

Methylglyoxal alters glucose metabolism and increases AGEs content in C6 glioma cells. *Metab Brain Dis* 27, 531–539.

Hansen, F., Pandolfo, P., Galland, F., Torres, F.V., Dutra, M.F., Batassini, C., Guerra, M.C., Leite, M.C., and Gonçalves, C.-A. (2016a). Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. *Physiology & Behavior* 164, 93–101.

Hansen, F., Battú, C.E., Dutra, M.F., Galland, F., Lirio, F., Broetto, N., Nardin, P., and Gonçalves, C.-A. (2016b). Methylglyoxal and carboxyethyllysine reduce glutamate uptake and S100B secretion in the hippocampus independently of RAGE activation. *Amino Acids* 48, 375–385.

Hansen, F., Galland, F., Lirio, F., de Souza, D.F., Da Ré, C., Pacheco, R.F., Vizuite, A.F., Quincozes-Santos, A., Leite, M.C., and Gonçalves, C.-A. (2017). Methylglyoxal Induces Changes in the Glyoxalase System and Impairs Glutamate Uptake Activity in Primary Astrocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 1–11.

Hanssen, N.M.J., Scheijen, J.L.J.M., Jorsal, A., Parving, H.-H., Tarnow, L., Rossing, P., Stehouwer, C.D.A., and Schalkwijk, C.G. (2017). Higher Plasma Methylglyoxal Levels Are Associated With Incident Cardiovascular Disease in Individuals With Type 1 Diabetes: A 12-Year Follow-up Study. *Diabetes* 66, 2278–2283.

Hanssen, N.M.J., Westerink, J., Scheijen, J.L.J.M., van der Graaf, Y., Stehouwer, C.D.A., Schalkwijk, C.G., and SMART Study Group (2018). Higher Plasma Methylglyoxal Levels Are Associated With Incident Cardiovascular Disease and Mortality in Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 41, 1689–1695.

Harris, J.J., Jolivet, R., and Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75, 762–777.

Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Rev* 57, 173–185.

Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Pierozan, P., de Lima, B.O., Reis, K.P., Torres, E.B., and Pessoa-Pureur, R. (2013). Methylglyoxal-induced cytotoxicity in neonatal rat brain: a role for oxidative stress and MAP kinases. *Metabolic Brain Disease* 28, 429–438.

Hernebring, M., Brolén, G., Aguilaniu, H., Semb, H., and Nyström, T. (2006). Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7700–7705.

Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolaños, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C–Cdh1. *Nat Cell Biol* 11, 747–752.

Hovatta, I., Tennant, R.S., Helton, R., Marr, R.A., Singer, O., Redwine, J.M., Ellison, J.A., Schadt, E.E., Verma, I.M., Lockhart, D.J., et al. (2005). Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438, 662–666.

Hoyer, S., Nitsch, R., and Oesterreich, K. (1991). Predominant abnormality in cerebral glucose utilization in late-onset dementia of the Alzheimer type: a cross-sectional

comparison against advanced late-onset and incipient early-onset cases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect 3*, 1–14.

Hsu, M.S., Seldin, M., Lee, D.J., Seifert, G., Steinhäuser, C., and Binder, D.K. (2011). Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. *Neuroscience* *178*, 21–32.

Huang, X., Wang, F., Chen, W., Chen, Y., Wang, N., and von Maltzan, K. (2012). Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain Research* *1469*, 82–91.

Hussain, M. (2016). Novel insights in the dysfunction of human blood-brain barrier after glycation. *Mechanisms of Ageing and Development* *7*.

Ichihara, S., Yamada, Y., Liu, F., Murohara, T., Itoh, K., Yamamoto, M., and Ichihara, G. (2010). Ablation of the Transcription Factor Nrf2 Promotes Ischemia-Induced Neovascularization by Enhancing the Inflammatory Response. *ATVB* *30*, 1553–1561.

Ighodaro, O.M. (2018). Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *7*.

Irshad, Z., Xue, M., Ashour, A., Larkin, J.R., Thornalley, P.J., and Rabbani, N. (2019). Activation of the unfolded protein response in high glucose treated endothelial cells is mediated by methylglyoxal. *Scientific Reports* *9*, 7889.

Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M.J., Kaufman, E., and Sokoloff, L. (2003). Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 4879–4884.

Jacob, A., and Alexander, J.J. (2014). Complement and blood-brain barrier integrity. *Mol Immunol* *61*, 149–152.

Jakel, R.J., Townsend, J.A., Kraft, A.D., and Johnson, J.A. (2007). Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res* *1144*, 192–201.

Jensen, T.M., Vistisen, D., Fleming, T., Nawroth, P.P., Rossing, P., Jørgensen, M.E., Lauritzen, T., Sandbaek, A., and Witte, D.R. (2016). Methylglyoxal is associated with changes in kidney function among individuals with screen-detected Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* *33*, 1625–1631.

Jia, X., Olson, D.J.H., Ross, A.R.S., and Wu, L. (2006). Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. *FASEB J* *20*, 1555–1557.

Jiang, L., Chen, X.-B., Wu, Q., Zhu, H.-Y., Du, C.-Y., Ying, M.-D., He, Q.-J., Zhu, H., Yang, B., and Cao, J. (2021). The C terminus of DJ-1 determines its homodimerization, MGO detoxification activity and suppression of ferroptosis. *Acta Pharmacol Sin* *42*, 1150–1159.

Johnston, G.A.R. (2005). *GABAA Receptor Channel Pharmacology*.

- Juaristi, I., Contreras, L., González-Sánchez, P., Pérez-Liébana, I., González-Moreno, L., Pardo, B., Del Arco, A., and Satrustegui, J. (2019). The Response to Stimulation in Neurons and Astrocytes. *Neurochem Res* 44, 2385–2391.
- Kalapos, M.P. (2008a). The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact* 171, 251–271.
- Kalapos, M.P. (2008b). METHYLGLYOXAL AND GLUCOSE METABOLISM: A HISTORICAL PERSPECTIVE AND FUTURE AVENUES FOR RESEARCH. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 23, 24.
- Kalapos, M.P. (2013). Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Research and Clinical Practice* 99, 260–271.
- Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2010). Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia* 53, 1506–1516.
- Kawaguchi, M., Shibata, N., Horiuchi, S., and Kobayashi, M. (2005). Glyoxal inactivates glutamate transporter-1 in cultured rat astrocytes. *Neuropathology* 25, 27–36.
- Kender, Z., Fleming, T., Kopf, S., Torzsa, P., Grolmusz, V., Herzig, S., Schleicher, E., Rácz, K., Reismann, P., and Nawroth, P.P. (2014). Effect of Metformin on Methylglyoxal Metabolism in Patients with Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122, 316–319.
- Kim, D., Kim, K.-A., Kim, J.-H., Kim, E.-H., and Bae, O.-N. (2020). Methylglyoxal-Induced Dysfunction in Brain Endothelial Cells via the Suppression of Akt/HIF-1 α Pathway and Activation of Mitophagy Associated with Increased Reactive Oxygen Species. *Antioxidants (Basel)* 9.
- Kodl, C.T., and Seaquist, E.R. (2008). Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29, 494–511.
- Koekkoek, L.L., Mul, J.D., and la Fleur, S.E. (2017). Glucose-Sensing in the Reward System. *Front. Neurosci.* 11.
- Kopf, D., and Frölich, L. (2009). Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *J Alzheimers Dis* 16, 677–685.
- Koye, D.N., Magliano, D.J., Nelson, R.G., and Pavkov, M.E. (2018). The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease* 25, 121–132.
- Krautwald, M., and Münch, G. (2010). Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins - A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? *Exp Gerontol* 45, 744–751.
- Kromer, S.A. (2005). Identification of Glyoxalase-I as a Protein Marker in a Mouse Model of Extremes in Trait Anxiety. *Journal of Neuroscience* 25, 4375–4384.

- Kuhla, B., Lüth, H.-J., Haferburg, D., Boeck, K., Arendt, T., and Münch, G. (2005). Methylglyoxal, Glyoxal, and Their Detoxification in Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, 211–216.
- Kuhla, B., Boeck, K., Lüth, H.-J., Schmidt, A., Weigle, B., Schmitz, M., Ogunlade, V., Münch, G., and Arendt, T. (2006). Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiology of Aging* 27, 815–822.
- Kuhla, B., Boeck, K., Schmidt, A., Ogunlade, V., Arendt, T., Münch, G., and Lüth, H.-J. (2007). Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of Aging* 28, 29–41.
- Kullmann, D.M., Ruiz, A., Rusakov, D.M., Scott, R., Semyanov, A., and Walker, M.C. (2005). Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol* 87, 33–46.
- Lapato, A.S., and Tiwari-Woodruff, S.K. (2018). Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial homeostasis & disease. *J Neuro Res* 96, 31–44.
- Lapolla, A., Flamini, R., Vedova, A.D., Senesi, A., Reitano, R., Fedele, D., Basso, E., Seraglia, R., and Traldi, P. (2003). Glyoxal and Methylglyoxal Levels in Diabetic Patients: Quantitative Determination by a New GC/MS Method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41.
- Lapolla, A., Traldi, P., and Fedele, D. (2005). Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem* 38, 103–115.
- Lebon, V., Petersen, K.F., Cline, G.W., Shen, J., Mason, G.F., Dufour, S., Behar, K.L., Shulman, G.I., and Rothman, D.L. (2002). Astroglial Contribution to Brain Energy Metabolism in Humans Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Elucidation of the Dominant Pathway for Neurotransmitter Glutamate Repletion and Measurement of Astrocytic Oxidative Metabolism. *J. Neurosci.* 22, 1523–1531.
- Lee, H.K., Seo, I.A., Suh, D.J., Lee, H.J., and Park, H.T. (2009). A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in neuroglial cells. *J Neurochem* 108, 273–284.
- Li, W. (2013). Acute carbonyl stress induces occludin glycation and brain microvascular endothelial barrier dysfunction Role for glutathione-dependent metabolism of methylglyoxal. *Free Radical Biology and Medicine* 11.
- Li, T., Giaume, C., and Xiao, L. (2014). Connexins-mediated glia networking impacts myelination and remyelination in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 49, 1460–1471.
- Li, W., Maloney, R.E., and Aw, T.Y. (2015). High glucose, glucose fluctuation and carbonyl stress enhance brain microvascular endothelial barrier dysfunction: Implications for diabetic cerebral microvasculature. *Redox Biology* 5, 80–90.
- Li, X.-H., Xie, J.-Z., Jiang, X., Lv, B.-L., Cheng, X.-S., Du, L.-L., Zhang, J.-Y., Wang, J.-Z., and Zhou, X.-W. (2012). Methylglyoxal Induces Tau Hyperphosphorylation via Promoting AGEs Formation. *NeuroMolecular Medicine* 14, 338–348.

- Li, X.-H., Du, L.-L., Cheng, X.-S., Jiang, X., Zhang, Y., Lv, B.-L., Liu, R., Wang, J.-Z., and Zhou, X.-W. (2013). Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid. *Cell Death & Disease* 4, e673–e673.
- Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W., and Levison, S.W. (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89, 1092–1100.
- Lissner, L.J., Rodrigues, L., Wartchow, K.M., Borba, E., Bobermin, L.D., Fontella, F.U., Hansen, F., Quincozes-Santos, A., Souza, D.O.G., and Gonçalves, C.-A. (2021). Short-Term Alterations in Behavior and Astroglial Function After Intracerebroventricular Infusion of Methylglyoxal in Rats. *Neurochem Res* 46, 183–196.
- Liu, Y.-W., Zhu, X., Yang, Q.-Q., Lu, Q., Wang, J.-Y., Li, H.-P., Wei, Y.-Q., Yin, J.-L., and Yin, X.-X. (2013). Suppression of methylglyoxal hyperactivity by mangiferin can prevent diabetes-associated cognitive decline in rats. *Psychopharmacology* 228, 585–594.
- Liu, Y.-W., Cheng, Y.-Q., Liu, X.-L., Hao, Y.-C., Li, Y., Zhu, X., Zhang, F., and Yin, X.-X. (2017). Mangiferin Upregulates Glyoxalase 1 Through Activation of Nrf2/ARE Signaling in Central Neurons Cultured with High Glucose. *Mol Neurobiol* 54, 4060–4070.
- Loos, M., van der Sluis, S., Bochdanovits, Z., van Zutphen, I.J., Pattij, T., Stiedl, O., Neuro-BSIK Mouse Phenomics consortium, Smit, A.B., and Spijker, S. (2009). Activity and impulsive action are controlled by different genetic and environmental factors. *Genes Brain Behav* 8, 817–828.
- Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A.M., Bonvento, G., Murphy, M.P., Almeida, A., and Bolaños, J.P. (2016). Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 13063–13068.
- Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., He, W., Lin, J.H.-C., Han, X., Takano, T., Wang, S., Sim, F.J., et al. (2007). The Transcriptome and Metabolic Gene Signature of Protoplasmic Astrocytes in the Adult Murine Cortex. *J. Neurosci.* 27, 12255–12266.
- Lund-Andersen, H. (1979). Transport of glucose from blood to brain. *Physiological Reviews* 59, 305–352.
- MacLean, M., Derk, J., Ruiz, H.H., Juranek, J.K., Ramasamy, R., and Schmidt, A.M. (2019). The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and DIAPH1: Implications for vascular and neuroinflammatory dysfunction in disorders of the central nervous system. *Neurochem Int* 126, 154–164.
- Martins, S.I.F.S., Marcelis, A.T.M., and van Boekel, M.A.J.S. (2003). Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part I--reaction mechanism. *Carbohydr Res* 338, 1651–1663.
- Matafome, P., Rodrigues, T., Sena, C., and Seica, R. (2017). Methylglyoxal in Metabolic Disorders: Facts, Myths, and Promises: METHYLGLYOXAL IN METABOLIC DISORDERS. *Medicinal Research Reviews* 37, 368–403.

- Matsuda, N., Kimura, M., Queliconi, B.B., Kojima, W., Mishima, M., Takagi, K., Koyano, F., Yamano, K., Mizushima, T., Ito, Y., et al. (2017). Parkinson's disease-related DJ-1 functions in thiol quality control against aldehyde attack in vitro. *Sci Rep* 7, 12816.
- McDonald, D.M., Coleman, G., Bhatwadekar, A., Gardiner, T.A., and Stitt, A.W. (2009). Advanced glycation of the Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide motif modulates retinal microvascular endothelial cell dysfunction. *Mol Vis* 15, 1509–1520.
- McLellan, A.C., and Thornalley, P.J. (1992). Synthesis and chromatography of 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene, 6,7-dimethoxy-2-methylquinoxaline and 6,7-dimethoxy-2,3-dimethylquinoxaline for use in a liquid chromatographic fluorimetric assay of methylglyoxal. *Analytica Chimica Acta* 263, 137–142.
- McMurray, K.M.J. (2016). Neuronal overexpression of Glo1 or amygdalar microinjection of methylglyoxal is sufficient to regulate anxiety-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research* 5.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., and Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36, 587–597.
- Mey, J.T., and Haus, J.M. (2018). Dicarbonyl Stress and Glyoxalase-1 in Skeletal Muscle: Implications for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Cardiovasc Med* 5, 117.
- Michetti, F., Dell'Anna, E., Tiberio, G., and Cocchia, D. (1983). Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res* 262, 352–356.
- Molina, D.K., and DiMaio, V.J.M. (2012). Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. *Am J Forensic Med Pathol* 33, 368–372.
- de la Monte, S.M. (2012). Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs* 72, 49–66.
- de la Monte, S.M., and Wands, J.R. (2005). Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 7, 45–61.
- de la Monte, S.M., Longato, L., Tong, M., and Wands, J.R. (2009). Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Investig Drugs* 10, 1049–1060.
- Moraru, A., Wiederstein, J., Pfaff, D., Fleming, T., Miller, A.K., Nawroth, P., and Teleanu, A.A. (2018). Elevated Levels of the Reactive Metabolite Methylglyoxal Recapitulate Progression of Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism* 27, 926-934.e8.
- Morcos, M., Du, X., Pfisterer, F., Hutter, H., Sayed, A.A.R., Thornalley, P., Ahmed, N., Baynes, J., Thorpe, S., Kukudov, G., et al. (2008). Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7, 260–269.
- Mosconi, L., Pupi, A., and De Leon, M.J. (2008). Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 180–195.

- Mosconi, L., Mistur, R., Switalski, R., Tsui, W.H., Glodzik, L., Li, Y., Pirraglia, E., De Santi, S., Reisberg, B., Wisniewski, T., et al. (2009). FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36, 811–822.
- Münch, G., Kuhla, B., Lüth, H.-J., Arendt, T., and Robinson, S.R. (2003). Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 31, 1397–1399.
- Murata-Kamiya, N., and Kamiya, H. (2001). Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. *Nucleic Acids Res* 29, 3433–3438.
- Muronetz, V.I., Melnikova, A.K., Seferbekova, Z.N., Barinova, K.V., and Schmalhausen, E.V. (2017). Glycation, glycolysis, and neurodegenerative diseases: Is there any connection? *Biochemistry Moscow* 82, 874–886.
- Navale, A.M., and Paranjape, A.N. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev* 8, 5–9.
- Nemet, I., Vikić-Topić, D., and Varga-Defterdarović, L. (2004). Spectroscopic studies of methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide. *Bioorganic Chemistry* 32, 560–570.
- Nemet, I., Varga-Defterdarović, L., and Turk, Z. (2006). Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 1105–1117.
- Nicolay, J., Schneider, J., Niemoeller, O., Artunc, F., Portero-Otin, M., Haik Jr., G., Thornalley, P., Schleicher, E., Wieder, T., and Lang, F. (2006). Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Methylglyoxal. *Cell Physiol Biochem* 18, 223–232.
- Niermann, H., Amiry-Moghaddam, M., Holthoff, K., Witte, O.W., and Ottersen, O.P. (2001). A Novel Role of Vasopressin in the Brain: Modulation of Activity-Dependent Water Flux in the Neocortex. *J. Neurosci.* 21, 3045–3051.
- Nigro, C., Raciti, G.A., Leone, A., Fleming, T.H., Longo, M., Prevezano, I., Fiory, F., Mirra, P., D'Esposito, V., Ulianich, L., et al. (2014). Methylglyoxal impairs endothelial insulin sensitivity both in vitro and in vivo. *Diabetologia* 57, 1485–1494.
- Nitti, M., Piras, S., Brondolo, L., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., and Furfaro, A.L. (2018). Heme Oxygenase 1 in the Nervous System: Does It Favor Neuronal Cell Survival or Induce Neurodegeneration? *Int J Mol Sci* 19.
- Niture, S.K., Khatri, R., and Jaiswal, A.K. (2014). Regulation of Nrf2—an update. *Free Radical Biology and Medicine* 66, 36–44.
- Nusser, Z., Ahmad, Z., Tretter, V., Fuchs, K., Wisden, W., Sieghart, W., and Somogyi, P. (1999). Alterations in the expression of GABAA receptor subunits in cerebellar granule cells after the disruption of the $\alpha 6$ subunit gene. *European Journal of Neuroscience* 11, 1685–1697.
- Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R.M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19, 1584–1596.

Ohara, T. (2013). [Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 115, 90–97.

de Oliveira, M.R., Ferreira, G.C., Schuck, P.F., and Dal Bosco, S.M. (2015). Role for the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway in the protective effects of carnosic acid against methylglyoxal-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Chemico-Biological Interactions* 242, 396–406.

Palanissami, G., and Paul, S.F.D. (2018). RAGE and Its Ligands: Molecular Interplay Between Glycation, Inflammation, and Hallmarks of Cancer-a Review. *Horm Cancer* 9, 295–325.

Patching, S.G. (2017). Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. *Mol Neurobiol* 54, 1046–1077.

Patel, S., and Santani, D. (2009). Role of NF- κ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacological Reports* 9.

Pellerin, L. (2018). Neuroenergetics: Astrocytes Have a Sweet Spot for Glucose. *Curr Biol* 28, R1258–R1260.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 10625–10629.

Peskind, E.R., Griffin, W.S.T., Akama, K.T., Raskind, M.A., and Van Eldik, L.J. (2001). Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 39, 409–413.

Phillips, S.A., and Thornalley, P.J. (1993). The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *European Journal of Biochemistry* 212, 101–105.

Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L.M., Daniel, K., Reece, J.M., Deeney, J.T., Andersen, M.E., Corkey, B.E., et al. (2007). Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56, 1783–1791.

Pompliano, D.L., Peyman, A., and Knowles, J.R. (1990). Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29, 3186–3194.

Pugazhenthii, S., Qin, L., and Reddy, P.H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863, 1037–1045.

Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2008). Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 36, 1045–1050.

Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2012). Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids* 42, 1087–1096.

- Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2014a). Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc* 9, 1969–1979.
- Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2014b). The Critical Role of Methylglyoxal and Glyoxalase 1 in Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 63, 50–52.
- Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2015). Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458, 221–226.
- Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2018). Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney International* 93, 803–813.
- Rabbani, N., Sebekova, K., Sebekova, K., Heidland, A., and Thornalley, P.J. (2007). Accumulation of free adduct glycation, oxidation, and nitration products follows acute loss of renal function. *Kidney Int* 72, 1113–1121.
- Rabbani, N., Xue, M., and Thornalley, P.J. (2016). Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconjugate Journal* 33, 513–525.
- Ramasamy, R., Yan, S.F., and Schmidt, A.M. (2006). Methylglyoxal Comes of AGE. *Cell* 124, 258–260.
- Ramasamy, R., Yan, S.F., and Schmidt, A.M. (2011). Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications: RAGE, signal transduction, and diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1243, 88–102.
- Reiner-Benaim, A., Yekutieli, D., Letwin, N.E., Elmer, G.I., Lee, N.H., Kafkafi, N., and Benjamini, Y. (2007). Associating quantitative behavioral traits with gene expression in the brain: searching for diamonds in the hay. *Bioinformatics* 23, 2239–2246.
- Riboulet-Chavey, A., Pierron, A., Durand, I., Murdaca, J., Giudicelli, J., and Van Obberghen, E. (2006). Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes* 55, 1289–1299.
- Richard, J.P. (1993). Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans* 21, 549–553.
- Rose, C.F., Verkhatsky, A., and Parpura, V. (2013). Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochemical Society Transactions* 41, 1518–1524.
- Ryan, C.M. (1988). Neurobehavioral complications of type I diabetes. Examination of possible risk factors. *Diabetes Care* 11, 86–93.
- Sagheddu, R., Chiappalupi, S., Salvadori, L., Riuzzi, F., Donato, R., and Sorci, G. (2018). Targeting RAGE as a potential therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 27, 3734–3746.

- Salas, I.H., and De Strooper, B. (2019). Diabetes and Alzheimer's Disease: A Link not as Simple as it Seems. *Neurochem Res* 44, 1271–1278.
- Saleh, I., Maritska, Z., Parisa, N., and Hidayat, R. (2019). Inhibition of Receptor for Advanced Glycation End Products as New Promising Strategy Treatment in Diabetic Retinopathy. *OAMJMS* 7.
- Sandu, O., Song, K., Cai, W., Zheng, F., Uribarri, J., and Vlassara, H. (2005). Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in High-Fat-Fed Mice Are Linked to High Glycotoxin Intake. *54*, 6.
- dos Santos, J.P.A., Vizuete, A., Hansen, F., Biasibetti, R., and Gonçalves, C.-A. (2017). Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. *JAD* 61, 237–249.
- Schalkwijk, C.G., and Stehouwer, C.D.A. (2020). Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases. *Physiol. Rev.* 100, 407–461.
- Schalkwijk, C.G., Brouwers, O., and Stehouwer, C.D.A. (2008). Modulation of insulin action by advanced glycation endproducts: a new player in the field. *Horm Metab Res* 40, 614–619.
- Schumacher, D., Morgenstern, J., Oguchi, Y., Volk, N., Kopf, S., Groener, J.B., Nawroth, P.P., Fleming, T., and Freichel, M. (2018). Compensatory mechanisms for methylglyoxal detoxification in experimental & clinical diabetes. *Molecular Metabolism* 18, 143–152.
- Scott, S., and Aricescu, A.R. (2019). A structural perspective on GABAA receptor pharmacology. *Curr Opin Struct Biol* 54, 189–197.
- Scott, H.A., Gebhardt, F.M., Mitrovic, A.D., Vandenberg, R.J., and Dodd, P.R. (2011). Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32, 553.e1-11.
- Sebastião, I., Candeias, E., Santos, M.S., de Oliveira, C.R., Moreira, P.I., and Duarte, A.I. (2014). Insulin as a Bridge between Type 2 Diabetes and Alzheimer Disease – How Anti-Diabetics Could be a Solution for Dementia. *Front. Endocrinol.* 5.
- Sena, C.M., Matafome, P., Crisóstomo, J., Rodrigues, L., Fernandes, R., Pereira, P., and Seica, R.M. (2012). Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacological Research* 65, 497–506.
- de Senna, P.N., Ilha, J., Baptista, P.P.A., do Nascimento, P.S., Leite, M.C., Paim, M.F., Gonçalves, C.A., Achaval, M., and Xavier, L.L. (2011). Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis* 26, 269–279.
- Serres, S., Bezancon, E., Franconi, J.-M., and Merle, M. (2005). Ex vivo NMR study of lactate metabolism in rat brain under various depressed states. *Journal of Neuroscience Research* 79, 19–25.

Shah, K., DeSilva, S., and Abbruscato, T. (2012). The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 12629–12655.

Shibamoto, T. (2006). Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 12–25.

Shuster, S.O., Fica-Contreras, S.M., Hedges, J.S., Henning, N.J., and Choi, S. (2020). Comparison of the reaction of methylglyoxal (MGO) with murine and human amyloid beta (A β): Insights into a mechanism of Alzheimer's disease (AD). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 533, 1298–1302.

Shuvaev, V.V., Laffont, I., Serot, J.M., Fujii, J., Taniguchi, N., and Siest, G. (2001). Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22, 397–402.

Silverberg, G.D., Heit, G., Huhn, S., Jaffe, R.A., Chang, S.D., Bronte-Stewart, H., Rubenstein, E., Possin, K., and Saul, T.A. (2001). The cerebrospinal fluid production rate is reduced in dementia of the Alzheimer's type. *Neurology* 57, 1763–1766.

Sommerfield, A.J., Deary, I.J., and Frier, B.M. (2004). Acute hyperglycemia alters mood state and impairs cognitive performance in people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 2335–2340.

de Souza, D.F., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L.S., Rigo, M.M., Gottfried, C., Leal, R.B., and Gonçalves, C.-A. (2009). S100B secretion is stimulated by IL-1 β in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *Journal of Neuroimmunology* 206, 52–57.

de Souza, D.F., Wartchow, K., Hansen, F., Lunardi, P., Guerra, M.C., Nardin, P., and Gonçalves, C.-A. (2013). Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 43, 14–22.

Spauwen, P.J.J., Köhler, S., Verhey, F.R.J., Stehouwer, C.D.A., and van Boxtel, M.P.J. (2013). Effects of type 2 diabetes on 12-year cognitive change: results from the Maastricht Aging Study. *Diabetes Care* 36, 1554–1561.

Srikanth, V., Westcott, B., Forbes, J., Phan, T.G., Beare, R., Venn, A., Pearson, S., Greenaway, T., Parameswaran, V., and Münch, G. (2013). Methylglyoxal, Cognitive Function and Cerebral Atrophy in Older People. *The Journals of Gerontology: Series A* 68, 68–73.

Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R., and de la Monte, S.M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 7, 63–80.

Steiner, J., Bernstein, H.-G., Bielau, H., Berndt, A., Brisch, R., Mawrin, C., Keilhoff, G., and Bogerts, B. (2007). Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci* 8, 2.

- Strachan, M.W.J., Reynolds, R.M., Marioni, R.E., and Price, J.F. (2011). Cognitive function, dementia and type 2 diabetes mellitus in the elderly. *Nature Reviews Endocrinology* 7, 108–114.
- Syapin, P.J. (2009). Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders: Regulating HO-1 in the CNS. *British Journal of Pharmacology* 155, 623–640.
- Szablewski, L. (2017). Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 55, 1307–1320.
- Szczepanik, J.C., de Almeida, G.R.L., Cunha, M.P., and Dafre, A.L. (2020). Repeated Methylglyoxal Treatment Depletes Dopamine in the Prefrontal Cortex, and Causes Memory Impairment and Depressive-Like Behavior in Mice. *Neurochem Res* 45, 354–370.
- Taghavi, F., Habibi-Rezaei, M., Amani, M., Saboury, A.A., and Moosavi-Movahedi, A.A. (2017). The status of glycation in protein aggregation. *Int J Biol Macromol* 100, 67–74.
- Tajes, M. (2014). Methylglyoxal reduces mitochondrial potential and activates Bax and caspase-3 in neurons: Implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 5.
- Taki-Nakano, N., Ohzeki, H., Kotera, J., and Ohta, H. (2014). Cytoprotective effects of 12-oxo phytodienoic acid, a plant-derived oxylipin jasmonate, on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 3413–3422.
- Tamae, D., Lim, P., Wuenschell, G.E., and Termini, J. (2011). Mutagenesis and Repair Induced by the DNA Advanced Glycation End Product N2-1-(Carboxyethyl)-20-deoxyguanosine in Human Cells. 9.
- Thorens, B. (2011). Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13, 82–88.
- Thornalley, P.J. (1993a). The glyoxalase system in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 14, 287–371.
- Thornalley, P.J. (1993b). The glyoxalase system in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 14, 287–371.
- Thornalley, P.J. (1996). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* 27, 565–573.
- Thornalley, P.J. (1998a). Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)* 44, 1013–1023.
- Thornalley, P.J. (1998b). Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem Biol Interact* 111–112, 137–151.

- Thornalley, P.J. (2005). Dicarbonyl Intermediates in the Maillard Reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, 111–117.
- Thornalley, P.J., and Rabbani, N. (2011a). Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, 318–325.
- Thornalley, P.J., and Rabbani, N. (2011b). Protein damage in diabetes and uremia—identifying hotspots of proteome damage where minimal modification is amplified to marked pathophysiological effect. *Free Radical Research* 45, 89–100.
- Tóth, A.E., Walter, F.R., Bocsik, A., Sántha, P., Veszelka, S., Nagy, L., Puskás, L.G., Couraud, P.-O., Takata, F., Dohgu, S., et al. (2014a). Edaravone Protects against Methylglyoxal-Induced Barrier Damage in Human Brain Endothelial Cells. *PLoS ONE* 9, e100152.
- Tóth, A.E., Tóth, A., Walter, F.R., Kiss, L., Veszelka, S., Ózsvári, B., Puskás, L.G., Heimesaat, M.M., Dohgu, S., Kataoka, Y., et al. (2014b). Compounds Blocking Methylglyoxal-induced Protein Modification and Brain Endothelial Injury. *Archives of Medical Research* 45, 753–764.
- Tumani, H., Huss, A., and Bachhuber, F. (2017). The cerebrospinal fluid and barriers - anatomic and physiologic considerations. *Handb Clin Neurol* 146, 21–32.
- Tumminia, A., Vinciguerra, F., Parisi, M., and Frittitta, L. (2018). Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Role of Insulin Signalling and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* 19.
- Turk, Z. (2010). Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res* 59, 147–156.
- Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppas, M., Goldberg, T., and Vlassara, H. (2005). Diet-Derived Advanced Glycation End Products Are Major Contributors to the Body's AGE Pool and Induce Inflammation in Healthy Subjects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, 461–466.
- Vander Jagt, D.L., and Hunsaker, L.A. (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.
- VanGilder, R.L., Kelly, K.A., Chua, M.D., Ptachcinski, R.L., and Huber, J.D. (2009). Administration of sesamol improved blood-brain barrier function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Brain Res* 197, 23–34.
- Vella, J., Zammit, C., Di Giovanni, G., Muscat, R., and Valentino, M. (2015). The central role of aquaporins in the pathophysiology of ischemic stroke. *Front Cell Neurosci* 9, 108.
- Verkman, A.S., Smith, A.J., Phuan, P., Tradtrantip, L., and Anderson, M.O. (2017). The aquaporin-4 water channel as a potential drug target in neurological disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21, 1161–1170.

- Vitek, M.P., Bhattacharya, K., Glendening, J.M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., Manogue, K., and Cerami, A. (1994). Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4766–4770.
- Vlassara, H., Cai, W., Crandall, J., Goldberg, T., Oberstein, R., Dardaine, V., Peppas, M., and Rayfield, E.J. (2002). Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15596–15601.
- Vulesevic, B., McNeill, B., Giacco, F., Maeda, K., Blackburn, N.J.R., Brownlee, M., Milne, R.W., and Suuronen, E.J. (2016). Methylglyoxal-Induced Endothelial Cell Loss and Inflammation Contribute to the Development of Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes* *65*, 1699–1713.
- Wang, C.-Y., Liu, H.-J., Chen, H.-J., Lin, Y.-C., Wang, H.-H., Hung, T.-C., and Yeh, H.-I. (2011). AGE-BSA down-regulates endothelial connexin43 gap junctions. *BMC Cell Biol* *12*, 19.
- Wang, K.K., Yang, Z., Zhu, T., Shi, Y., Rubenstein, R., Tyndall, J.A., and Manley, G.T. (2018). An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn* *18*, 165–180.
- Wartchow, K.M., Rodrigues, L., Lissner, L.J., Federhen, B.C., Selistre, N.G., Moreira, A., Gonçalves, C.-A., and Sesterheim, P. (2020). Insulin-producing cells from mesenchymal stromal cells: Protection against cognitive impairment in diabetic rats depends upon implant site. *Life Sci* *251*, 117587.
- Weisman, D., Hakimian, E., and Ho, G.J. (2006). Interleukins, Inflammation, and Mechanisms of Alzheimer’s Disease. In *Vitamins & Hormones*, (Academic Press), pp. 505–530.
- Welcome, M.O., and Mastorakis, N.E. (2018). Emerging Concepts in Brain Glucose Metabolic Functions: From Glucose Sensing to How the Sweet Taste of Glucose Regulates Its Own Metabolism in Astrocytes and Neurons. *Neuromolecular Med* *20*, 281–300.
- West, R.K. (2014). Dietary advanced glycation end products are associated with decline in memory in young elderly. *Mechanisms of Ageing and Development* *3*.
- West, R.K., Moshier, E., Lubitz, I., Schmeidler, J., Godbold, J., Cai, W., Uribarri, J., Vlassara, H., Silverman, J.M., and Beeri, M.S. (2014). Dietary advanced glycation end products are associated with decline in memory in young elderly. *Mechanisms of Ageing and Development* *140*, 10–12.
- Williams, R., Lim, J.E., Harr, B., Wing, C., Walters, R., Distler, M.G., Teschke, M., Wu, C., Wiltshire, T., Su, A.I., et al. (2009). A common and unstable copy number variant is associated with differences in *Glo1* expression and anxiety-like behavior. *PLoS One* *4*, e4649.
- Xing, L., Yang, T., Cui, S., and Chen, G. (2019). Connexin Hemichannels in Astrocytes: Role in CNS Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* *12*, 23.

- Xu, J., Wang, H., Won, S.J., Basu, J., Kapfhamer, D., and Swanson, R.A. (2016). Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1: PARP-1, S100B, and Microglial Activation. *Glia* 64, 1869–1878.
- Xue, M., Rabbani, N., Momiji, H., Imbasi, P., Anwar, M.M., Kitteringham, N., Park, B.K., Souma, T., Moriguchi, T., Yamamoto, M., et al. (2012). Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *Biochem. J.* 443, 213–222.
- Yamazaki, Y., and Kanekiyo, T. (2017). Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease. *Int J Mol Sci* 18.
- Yang, Y., and Song, W. (2013). Molecular links between Alzheimer’s disease and diabetes mellitus. *Neuroscience* 250, 140–150.
- Yu, A.S., Hirayama, B.A., Timbol, G., Liu, J., Basarah, E., Kepe, V., Satyamurthy, N., Huang, S.-C., Wright, E.M., and Barrio, J.R. (2010). Functional expression of SGLTs in rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C1277-1284.
- Zaccardi, F., Webb, D.R., Yates, T., and Davies, M.J. (2016). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J* 92, 63–69.
- Zarkogianni, K., Litsa, E., Mitsis, K., Wu, P.-Y., Kaddi, C.D., Cheng, C.-W., Wang, M.D., and Nikita, K.S. (2015). A Review of Emerging Technologies for the Management of Diabetes Mellitus. *IEEE Trans Biomed Eng* 62, 2735–2749.
- Zhao, J., Liu, L., Li, X., Zhang, L., Lv, J., Guo, X., Chen, H., and Zhao, T. (2019). Neuroprotective effects of an Nrf2 agonist on high glucose-induced damage in HT22 cells. *Biol Res* 52, 53.
- Zielke, H.R., Zielke, C.L., and Baab, P.J. (2009). Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *Journal of Neurochemistry* 109, 24–29.
- Zimmer, D.B., Chessher, J., Wilson, G.L., and Zimmer, W.E. (1997). S100A1 and S100B Expression and Target Proteins in Type I Diabetes. *138*, 8.
- Zimmet, P.Z., Magliano, D.J., Herman, W.H., and Shaw, J.E. (2014). Diabetes: a 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2, 56–64.
- Zoja, C., Zanchi, C., and Benigni, A. (2015). Key pathways in renal disease progression of experimental diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 30 Suppl 4, iv54-59.

9. ANEXO

O desenvolvimento das atividades durante o doutorado sanduíche, no período de fevereiro de 2020 a dezembro de 2020, foi realizado no Laboratório de Miologia molecular e celular, do Departamento de Medicina Experimental da Universidade de Perugia, sob orientação do Professor Dr. Gugliermo Sorci. A interação com o grupo de pesquisa começou a partir da parceria científica com o agora professor aposentado Rosário Donato, desde 2004.

O grupo de pesquisa investiga, com particular atenção, o papel do RAGE e da proteína S100B na biologia das células precursoras musculares, regeneração e atrofia muscular (incluindo sarcopenia e caquexia cancerosa), e distrofia muscular, visando estudos principalmente acerca da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). Além disso, a estrutura do laboratório consiste em uma ampla estrutura com disposição de várias técnicas que utilizam biologia molecular, imunofluorescência, citoquímica e imunocitoquímica, cultura celular, PCR e RT-PCR, ELISA, Western Blotting bem como a disposição animais de laboratório, entre outros.

A DMD é uma doença neuromuscular causada por uma mutação em um gene localizado no cromossomo X, na qual a distrofina é sintetizada (Doorenweerd, 2020; Frigeri et al., 2002). A distrofina é um dos componentes essenciais no complexo de proteínas associados a ela, localizados no sarcolema, responsável pela integridade funcional e estrutural das mio fibras durante a contração (Sagheddu et al., 2018). A ausência da proteína é caracterizada pela progressiva degeneração muscular e inflamação crônica e, ao lado disso, prejuízos cognitivos e sintomas neuropsiquiátricos são prevalentes (Naidoo and Anthony, 2020; Sagheddu et al., 2018). O RAGE é envolvido na miogênese e inflamação, ausente em músculos adultos saudáveis, mas re-expressos

em mioblastos, regenerando fibras e ativando células do sistema imune durante injúrias musculares agudas e certas miopatias (Sagheddu et al., 2018).

Dessa forma, objetivando aprofundar os conhecimentos acerca do papel do RAGE e seus ligantes, principalmente S100B e HMGB1, foram avaliados o perfil desses ligantes bem como vias de regulação a resposta inflamatória hipocampais em camundongos duplo mutantes, mdx e mdx/Ager^{-/-}, com idade avançada. Os dados apresentados aqui, são referentes apenas ao perfil da S100B e HMGB1 neste estudo, visto que ainda estamos trabalhando para o aperfeiçoamento de todos os resultados adquiridos.

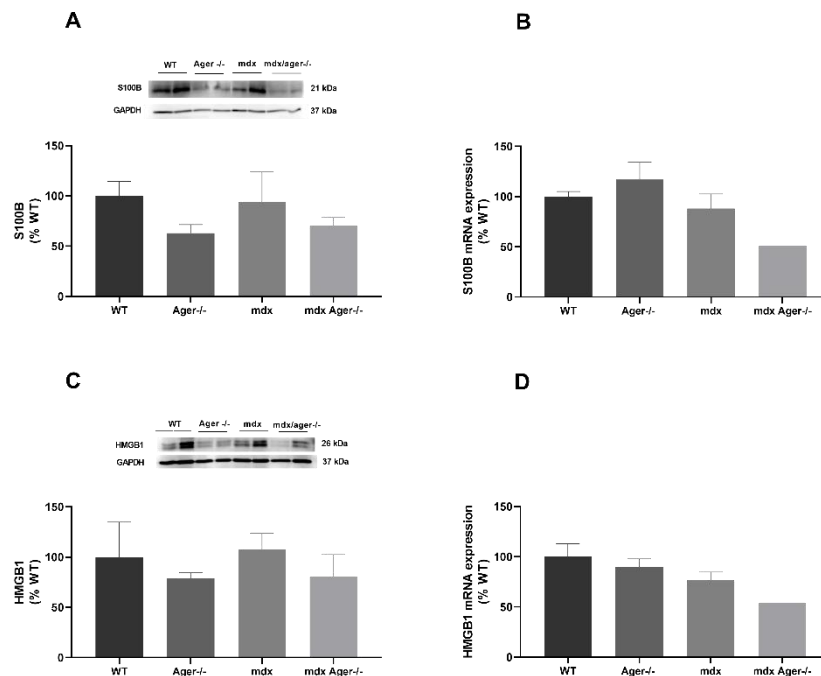


Figure 1. Profile of S100B and HMGB1 in mdx mice, an experimental of DMD, and double mutant, mdx/Ager^{-/-} mouse lacking dystrophin and RAGE. Hippocampal slices of rats were dissected out and immunocontents of hippocampal S100B and HMGB1 (A and C, respectively) was determined by western blotting and normalized by GAPDH, assuming wild type (WT) value as 100%. It was measured also the mRNA expression of these two proteins (B and D, respectively). Data are expressed as means \pm S.E.M (N = 2-3 animals per group). Data were analyzed by one-way ANOVA. Tukey's post hoc test was performed assuming $p \leq 0.05$ and the statistical significance represents difference from the WT group.

Referências - Anexo

Doorenweerd, N. (2020). Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy - a narrative review. *Neuromuscular Disorders* 30, 437–442.

Frigeri, A., Nicchia, G.P., Repetto, S., Bado, M., Minetti, C., and Svelto, M. (2002). Altered aquaporin-4 expression in human muscular dystrophies: a common feature *FASEB J* 16, 1120–1122.

Naidoo, M., and Anthony, K. (2020). Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Neurobiol* 57, 1748–1767.

Sagheddu, R., Chiappalupi, S., Salvadori, L., Riuzzi, F., Donato, R., and Sorci, G. (2018). Targeting RAGE as a potential therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 27, 3734–3746.