

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

**Efeitos do metilglioxal sobre o metabolismo energético,
parâmetros de estresse oxidativo e astrogliais em células de
glioma C6**

Fernanda Hansen

Orientadores:

Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry (*in memoriam*)

Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2011

Dedico esta dissertação aos meus pais, pelo constante apoio,
incentivo e compreensão e por sempre acreditarem
em mim e no meu potencial.

“Devemos medir o serviço não pelas coisas feitas,
mas pelas dificuldades vencidas.”

John R. Mott

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, obrigada pela compreensão, paciência, apoio constante e pelo amor incondicional. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, Fábio, pelo grande exemplo de profissional. Te amo!

Ao Felipe, pelo amor, companheirismo, paciência e compreensão. Por me ensinar a tornar a vida mais simples e mais alegre. Obrigada por fazer parte de minha vida e tornar meus dias cada vez mais felizes. Te amo muito!

À tia Cere pelo constante apoio e carinho. Obrigada!

À Caren pela amizade, apoio, incentivo e por ter me conduzido até aqui. Muito obrigada!

À Cibele, obrigada pelas conversas, pela paciência e compreensão.

À Giovana (Gi), pela amizade, pelas risadas, pelo carinho. Te adoro muito!

À Simone e Ana, pela amizade, ajuda e apoio constantes. Vocês são muito especiais pra mim! Sem vocês esse trabalho não seria o mesmo! Adoro vocês!

À Dani, pela imensa paciência, por todos ensinamentos, pela amizade, pelo exemplo de pesquisadora. Obrigada também pelos conselhos, conversas e pela torcida. Te adoro muito!

À Rê e Pati, pela amizade, pelo carinho e por sempre poder contar com vocês. Adoro vocês!

À (professora) Marina, pela ajuda constante, pela amizade e pelo exemplo de profissionalismo. Muito obrigada!

Ao André pela constante ajuda e pelas conversas divertidas. Gosto de trabalhar contigo!

À Lari e a Caro, colegas de mestrado (e de doutorado) por dividirem as angústias, medos e alegrias, pela agradável companhia e pela amizade.

À Fafá, Carol, Elisa, Maria, Lucas, Paulinha, Jô, Nina, Márcio, Ana Carolina, Krista, Adri, Cris, Beta, Paulo, Jaque, Caren, Tamara, Ana Paula, Émerson e a todos do laboratório 33, por sempre tornarem o ambiente agradável, pelas conversas, pela torcida e ajuda.

À Júlia, Fernanda, Carolina, Bárbara, Lisi e Cíntia, pessoas especiais que conheci no laboratório 27, pela amizade e ajuda.

Ao Departamento de Bioquímica, pela estrutura oferecida e dedicação dos funcionários.

Ao professor Perry, pelos ensinamentos, pela paciência, pela compreensão e pelo grande exemplo de professor e pesquisador. Muito obrigada por tudo! Você faz muita falta!

Ao professor CA, pelo apoio, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório e por acreditar em mim. Pelo otimismo contagiante e por seu exemplo, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
INTRODUÇÃO	4
1.1 Diabetes mellitus	4
1.1.1 Diabetes mellitus e sistema nervoso central.....	5
1.1.2 Mediadores do dano na Diabetes Mellitus	7
1.2 Metilglioxal.....	11
1.2.1 Fontes e destinos do metilglioxal.....	11
1.2.2 Metilglioxal, Diabetes Mellitus e Doença de Alzheimer	15
1.3 Astrócitos	16
1.3.1 Glioma C6.....	18
OBJETIVOS.....	19
Objetivo geral.....	19
Objetivos específicos.....	19
CAPÍTULO 1- Methylglyoxal alters glyoxalase system activity and glucose metabolism in C6 astroglial cells.....	20
CAPÍTULO 2 - Methylglyoxal alters glutathione content and glutamate uptake in C6 astroglial cells.....	55
DISCUSSÃO	82
CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	92

RESUMO

O metilglioxal é um composto dicarbonil - extremamente reativo, que está envolvido na patogênese de diversas doenças, como diabetes mellitus e doença de Alzheimer. Sua citotoxicidade é atribuída principalmente à formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation End Products*). Apesar da disfunção astrogliar parecer estar envolvida no surgimento de doenças neurodegenerativas – dentre elas a demência microvascular e a doença de Alzheimer, o efeito do metilglioxal sobre as funções desta célula foi pouco abordado. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do metilglioxal, em curto (1 hora e 3 horas) e longo prazo (24 horas), sobre o metabolismo energético, parâmetros de estresse oxidativo e astrogliais em células de glioma C6. O metilglioxal não foi capaz de alterar a morte e viabilidade celular em nenhum dos momentos até 24 horas de exposição. A secreção de S100B, um marcador de ativação astrogliar, não foi alterada. Além disso, a incubação com metilglioxal mostrou-se capaz de aumentar a produção de espécies reativas e reduzir o conteúdo intracelular de glutathiona (GSH) em 1 e 24 horas. Observou-se também aumento do conteúdo extracelular de GSH e da captação de glutamato em 1 hora, seguido por uma diminuição desses parâmetros em 24 horas. Verificou-se aumento da captação de glicose e da oxidação de glicose e de glicina a CO_2 em 1 hora e aumento da conversão de glicose e de glicina a lipídios em 3 horas e em 1 hora, respectivamente. Já a síntese protéica a partir de glicina diminuiu em 1 e 3 horas. A oxidação de lactato a CO_2 não foi alterada nos períodos estudados. Verificou-se que a atividade das enzimas glioxalase I e II estava diminuída em 24 horas de exposição ao metilglioxal, efeito que foi acompanhado de um aumento na quantidade de AGEs. Juntos, estes resultados fornecem evidência de que o metilglioxal prejudica o funcionamento das células astrogliais C6 através de alterações no metabolismo energético, no perfil oxidativo, do dano ao sistema glioxalase e do aumento do conteúdo de AGEs. Em períodos de maior exposição ao metilglioxal, as alterações observadas neste estudo poderiam ser exacerbadas, gerando um maior aumento da quantidade de metilglioxal intracelular e, assim, contribuindo com o surgimento ou agravamento de doenças neurodegenerativas.

ABSTRACT

Methylglyoxal is a dicarbonyl compound - extremely reactive, which is involved in the pathogenesis of several diseases, such as diabetes mellitus and Alzheimer's disease. Its cytotoxicity is mainly attributed to the formation of Advanced Glycation End Products (AGEs). Although, astroglial dysfunction seems to be involved in the onset of neurodegenerative diseases – such as microvascular dementia and Alzheimer's disease, the effect of methylglyoxal on the functions of this cell was a few times addressed. The aim of this study was to investigate the effect of methylglyoxal, in short (1 h and 3 h) and long term (24 h) on energy metabolism, oxidative stress and astroglial parameters in C6 cells. Methylglyoxal was not able to change the cell viability and cell death up to 24 h of exposure. Secretion of S100B, a marker of astroglial activation, was not altered. Furthermore, incubation with methylglyoxal was able to increase ROS formation and reduce the intracellular content of glutathione (GSH) at 1 and 24 h. We also observed increase in extracellular GSH levels and glutamate uptake in 1 h, followed by a decrease in these parameters in 24 h. We found increase in glucose uptake and in glucose and glycine oxidation to CO₂ in 1 h and increase in the conversion of glucose and glycine in lipids in 3 h and 1 h, respectively. Protein synthesis from glycine decreased at 1 and 3 h. Lactate oxidation to CO₂ was not changed. It was found that the glyoxalase I and II activity was reduced in 24 h of methylglyoxal exposure, an effect that was accompanied by an increase in the amount of AGEs. Together, these results indicate that methylglyoxal affect the activity of the C6 astroglial cells through of alterations in energy metabolism, in oxidative profile, damage to the glyoxalase system and increased content of AGEs. In periods of increased exposure to methylglyoxal, the changes observed in this study could be exacerbated, leading to a higher increase of intracellular methylglyoxal and thus contributing to arise or worsening of neurodegenerative diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs: Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês *Advanced Glycation End Products*)

AMPA: Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol propiônico

ATP: Adenosina Trifosfato

CML: Carboximetil-lisina

DA: Doença de Alzheimer

DM: Diabetes Mellitus

ERO: Espécies Reativas do Oxigênio

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial

GLT-1: transportador de glutamato-1

GSH: Glutathiona

IL-6: Interleucina 6

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-fenil brometo de tetrazólio

Na⁺/K⁺-ATPase: sódio-potássio adenina trifosfatase

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADP: Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

OMS: Organização Mundial da Saúde

PARP: Poli (ADP ribose) polimerase

RAGE: Receptor para AGE

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus

A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica, crônica, caracterizada principalmente por hiperglicemia, bem como por alterações no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas. Essa doença ocorre tanto por uma produção deficiente de insulina quanto por resistência à ação desta. Desequilíbrio no metabolismo de lipídios pode causar aumento das concentrações intracelulares de acil-CoA de cadeia longa e diacilglicerol, os quais estão relacionados com a resistência à insulina (Yu et al. 2002, Russell 2004).

Existem dois tipos de diabetes mellitus. A diabetes tipo 1 (ou insulino-dependente) é caracterizada por uma produção deficiente de insulina, sendo que ocorre morte de mais de 95% das células β do pâncreas. A diabetes tipo 2 (ou insulino-independente) é caracterizada por resistência à insulina ou alteração da sinalização mediada por insulina (Robertson e Harmon 2006).

Atualmente, cerca de 1 bilhão de pessoas estão com sobrepeso ou obesas no mundo e, 60% de todos os casos de DM tipo 2 podem ser atribuídos ao sobrepeso (Smyth e Heron 2006). Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 250 milhões de pessoas sejam diabéticas, o que representa 7,9% da população adulta. Segundo projeções da OMS a população mundial de indivíduos diabéticos irá aumentar até 2025 em mais de 50%, representando cerca de 380 milhões de pessoas (Narayan et al. 2003). No Brasil, a taxa de prevalência de DM é de 9,7%, em 2008, variando conforme a região estudada. A região sudeste apresenta a maior taxa de prevalência (10,6%) e a região norte a menor (7,2%) (www.portal.saude.gov.br, página eletrônica do Ministério da Saúde, Governo Federal do Brasil, 2009).

A DM inclui alterações micro e macrovasculares, que estão relacionadas com a morbidade dessa doença. Embora as complicações macrovasculares tenham recebido maior atenção, as complicações microvasculares são características na diabetes e a hiperglicemia contribui para seu desenvolvimento (Huebschmann et al. 2006). Pacientes com diabetes tipo 1 ou 2 têm um aumento do risco de cerca de 40% para complicações diabéticas microvasculares, mesmo tendo um controle de glicemia aceitável (Narayan et al. 2003).

A diabetes apresenta alta morbi-mortalidade, com perda importante na qualidade de vida. Neste contexto, sabe-se que a diabetes e suas complicações têm um impacto econômico significativo sobre os indivíduos, as famílias, os sistemas de saúde e os países. A OMS estima que as mortes por diabetes duplicarão entre 2005 e 2030 (www.who.int, página eletrônica da *World Health International*, 2011).

1.1.1 Diabetes mellitus e sistema nervoso central

A demência é um grave e crescente problema de saúde pública, que é patologicamente caracterizada por um progressivo declínio da função cognitiva que afeta estruturas corticais e/ou subcorticais do cérebro além daquilo que poderia ser esperado no envelhecimento normal. A condição afeta cerca de 5% da população idosa com mais de 65 anos e 25% das pessoas acima de 80 anos, onde a Doença de Alzheimer (DA) representa mais de 50% dos casos (Ritchie e Lovestone 2002). Os casos de demência global prevalentes são cerca de 29 milhões, com 4,6 milhões de novos casos a cada ano (Ferri et al. 2005).

Diabetes e demência são dois dos maiores problemas prevalentes no envelhecimento. Mais de 10% dos idosos sofrem de diabetes e a prevalência está aumentando (Harris 1998, Harris et al. 1998). Neste contexto, diversos estudos

longitudinais têm demonstrado associação entre história de diabetes, déficit cognitivo (Elias et al. 1997) e demência (Ott et al. 1996, Ott et al. 1999).

As intervenções para prevenir e tratar as complicações microvasculares e macrovasculares clássicas da DM têm melhorado, de modo que as pessoas estão vivendo mais tempo com a doença. Esta tendência implica que as novas complicações da DM tipo 2, que ainda não são alvo de estratégias, devam começar a emergir (Strachan et al. 2011).

Sabe-se que a DM é um fator de risco estabelecido para o declínio cognitivo e é, também, um fator para o aumento do risco da DA. Este risco tem sido frequentemente atribuído à doença microvascular cerebral, que está relacionada com a hiperglicemia crônica (Kopf e Frolich 2009). Dados indicam que a DM tipo 2 está associada com um risco de 1,5 a 2,5 vezes maior de demência. A etiologia da demência e declínio cognitivo em pessoas com DM tipo 2 é provavelmente multifatorial. A hiperglicemia crônica está relacionada, bem como outros possíveis moderadores da função cognitiva, como os mediadores inflamatórios (Strachan et al. 2011).

A diabetes está intimamente associada com doenças vasculares, que parecem servir como fator de risco independente e como um mediador na associação entre diabetes e demência. A diabetes descontrolada e limítrofe foram mais associadas com a DA, sem co-morbidades vasculares. Contudo, DM descontrolada aumenta o risco de DA e doença vascular. Este achado sugere uma ligação direta entre a desregulação da glicose e a neurodegeneração (Xu et al. 2009).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado que a hiperinsulinemia ou resistência à insulina é um dos mecanismos que pode explicar o aumento do risco da DA em pacientes diabéticos (Qiu e Folstein 2006).

Nos últimos anos, a DA tem sido considerada, em parte, um distúrbio neuroendócrino, ainda referido por alguns como diabetes tipo 3. Pesquisas demonstram que o prejuízo na sinalização da insulina pode estar implicado no desenvolvimento da DA. A insulina possui diferentes funções no sistema nervoso central que incluem o controle dos processos de liberação de neurotransmissores nas sinapses e ativação de vias de sinalização associadas com aprendizagem e memória. Aliado a isso, foi demonstrado que neurotoxinas, ligantes difusos derivados da beta-amilóide, interrompem a transdução de sinal nas sinapses, fazendo com que a células se tornem resistentes à insulina (Kroner 2009).

Diabéticos geralmente exibem déficits em uma ampla variedade de domínios cognitivos (Brands et al. 2004). Da mesma forma, ratos com diabetes experimental induzida por estreptozotocina possuem desempenho comprometido em teste de aprendizagem espacial (Gispén e Biessels 2000). Déficits cognitivos relacionados ao diabetes são conhecidos pelo seu desenvolvimento precoce (Lebed et al. 2008).

Existem diferentes modelos animais para estudo da DM e elaboração de estratégias terapêuticas. A estreptozotocina é um modelo comumente utilizado para indução de DM em roedores, pois promove a morte das células β do pâncreas, causando hiperglicemia, bem como a presença de sintomas associados a DM, como polidipsia e poliúria. Estreptozotocina também é utilizada em modelos de demência, onde a administração intracerebroventricular é capaz de gerar déficit cognitivo em ratos (Rodrigues et al. 2009, Sharma e Gupta 2001).

1.1.2 Mediadores do dano na Diabetes Mellitus

Os mecanismos subjacentes a possível associação entre DM e DA ainda não estão completamente esclarecidos, contudo vários mecanismos podem explicar o efeito

da desregulação da glicose sobre a neurodegeneração. Mecanismos relativos à hiperglicemia crônica são provavelmente responsáveis pelas complicações micro e macrovasculares da DM, que incluem a via do poli¹, a via das hexosaminas, a ativação da proteína cinase C, a geração de estresse oxidativo, a ativação da poli (ADP ribose) polimerase (PARP) e o acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Brownlee 2001).

Outros mecanismos de dano causados pela hiperglicemia crônica sobre o encéfalo foram propostos, como o aumento do nível de cálcio livre, a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral, mudanças no metabolismo cerebral, bem como neuroinflamação (Garg et al. 2006). Marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa, IL-6 e TNF- α são associadas com a diabetes e também contribuem para o desenvolvimento da DA (McGeer et al. 2006). Pacientes com diabetes tipo 1 (Brands et al. 2004) e ratos diabéticos (induzidos por estreptozotocina) demonstram comprometimento eletrofisiológico, que pode ser o resultado do rompimento da modulação dos receptores pós-sinápticos AMPA nos processos dependentes de cálcio (Biessels et al. 2005, Lebed et al. 2008). Além disso, estudos mostram que a exposição direta a hiperglicemia leva à ativação da NADPH oxidase (Vincent et al. 2005), a qual gera superóxido. Este, por sua vez, promove disfunção mitocondrial e apoptose, promovendo neurodegeneração, inflamação e aterosclerose (Silver et al. 2007).

Alterações na insulina poderiam afetar o metabolismo do peptídeo beta-amilóide, o qual é encontrado na DA. A insulina parece estimular a secreção de peptídeo beta-amilóide e inibir a degradação extracelular deste através da competição pela enzima que degrada insulina (Gasparini e Xu 2003). Foi sugerido também que um defeito na sinalização de insulina pode aumentar a hiperfosforilação da proteína tau,

que, por sua vez, pode levar a formação de emaranhados neurofibrilares, presentes nos pacientes com DA (Korf et al. 2006).

Na hiperglicemia, a elevação da glicose intracelular resulta no aumento de sua conversão enzimática a sorbitol pela aldose redutase, com diminuição concomitante de NADPH. Na via do poliol, o sorbitol é oxidado a frutose, gerando NADH. Foi proposto que a oxidação de sorbitol aumenta a relação NADH:NAD⁺ citosólico, desta forma, inibindo a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Com a inibição desta enzima ocorre aumento da concentração de trioses fosfato (Williamson et al. 1993), que por sua vez, pode aumentar a formação de metilglioxal, um precursor dos AGEs, e diacilglicerol. Além disso, a redução da glicose à sorbitol consome NADPH, que é necessário para a regeneração de glutathione (GSH). Este fato pode induzir ou exacerbar o estresse oxidativo intracelular encontrado em diabéticos (Lee e Chung 1999). A utilização de inibidores da aldose redutase está relacionada com a diminuição das complicações da DM (Schemmel et al. 2010).

Os AGEs são um grupo complexo e heterogêneo de compostos que têm sido associados com as complicações da DM e da DA (Shangari e O'Brien 2004). Em pacientes com DM o risco aumentado para DA está associado com um acúmulo de AGEs nos emaranhados neurofibrilares e placas amilóides (Kroner 2009).

Os AGEs são produzidos por glicação não-enzimática. A glicação é a principal causa espontânea de dano a proteínas celulares e extracelulares em sistemas fisiológicos, acometendo aproximadamente 0,1 a 0,2% de resíduos de arginina e lisina (Thornalley et al. 2003, Thornalley 2002).

Endogenamente, açúcares redutores, como a glicose, reagem não enzimaticamente com grupos amino livres de diversas moléculas, tais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, através de uma série de reações que formam compostos

instáveis, chamados de bases de Schiff. Estas bases, por meio de rearranjos, dão origem a produtos estáveis, conhecidos como produtos de Amadori. Após, através de reações de oxidação e desidratação, os produtos de Amadori são degradados em uma variedade de compostos dicarbonis (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglicosona) que, sendo muito mais reativos do que os açúcares a partir dos quais são derivados, agem como propagadores da reação. Esses propagadores reagem com grupos amino livres e, através de reações de desidratação, oxidação e ciclização, formam compostos irreversíveis e insolúveis, os AGEs (Figura 1). Esta série de reações é conhecida como Reação de Maillard ou reações não enzimáticas da glicação (Lapolla et al. 2005b).

Os AGEs geram espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativam cascatas de sinalização inflamatória, via seu principal receptor de sinalização, o RAGE (Yan et al. 2008). Em ratos diabéticos foi mostrado que os níveis de compostos pró-oxidantes e RAGE aumentam, enquanto que os níveis de compostos antioxidantes decaem (King 2001).

A formação de AGEs a partir da glicose é menor do que a formação de AGEs a partir de precursores dicarbonis derivados da glicose (Degenhardt et al. 1998). O metilglioxal, em particular, é um composto dicarbonil, que pode ser formado tanto a partir de reações que dependem dos níveis de glicose (glicação não enzimática e a via do polioli) quanto de intermediários da glicólise, metabolismo de corpos cetônicos e catabolismo da treonina. A alta reatividade e as elevadas concentrações plasmáticas de metilglioxal indicam que este composto é um dos mais importantes mediadores do dano na DM (Lapolla et al. 2005b).

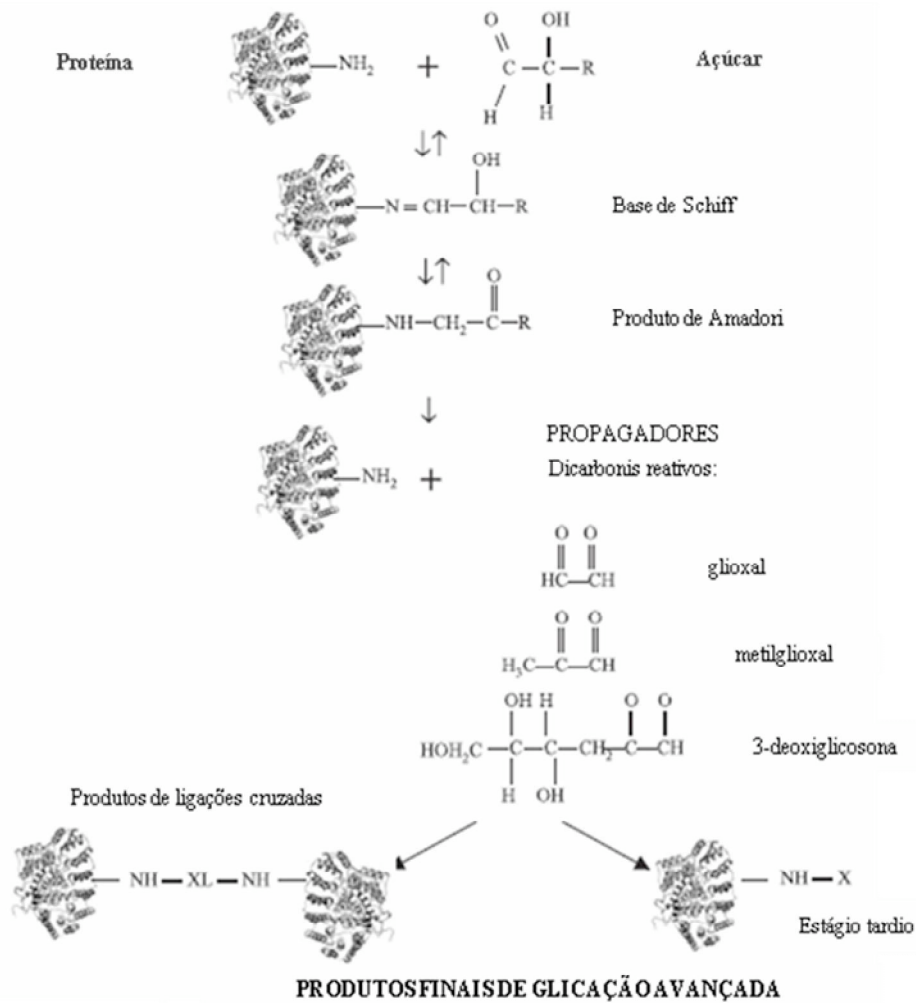


Figura 1. Os três passos das reações não enzimáticas da glicação. Adaptado de Lapolla et al. 2005b.

1.2 Metilglioal

1.2.1 Fontes e destinos do metilglioal

Existem diversas fontes de metilglioal em humanos. De acordo com a origem, as fontes podem ser classificadas em exógenas e endógenas. As fontes exógenas compreendem diversos produtos alimentares, fumaça do cigarro e a atmosfera urbana. As fontes do metilglioal em alimentos e bebidas são os açúcares, os produtos da reação

de Maillard, lipídios e microorganismos formados durante o processamento industrial, cozimento e armazenamento prolongado (Nemet et al. 2006).

Alguns fatores influenciam na maior formação de metilglioxal nos alimentos, como a temperatura e o tempo de preparação destes (Martins et al. 2003), a presença de monossacarídeos durante o aquecimento e a composição lipídica (Nemet et al. 2006). No entanto, sabe-se que o pH não influencia na formação de metilglioxal (Martins et al. 2003, Martins e Van Boekel 2003).

Além disso, acúmulo de metilglioxal também pode ocorrer durante o crescimento de microrganismos, no processo de fermentação. Os microrganismos liberam metilglioxal causando um aumento deste aldeído em bebidas alcoólicas (como o vinho) e produtos lácteos (Nemet et al. 2006). Metilglioxal também é encontrado em plantas, como no arroz, mostarda, tabaco, onde as concentrações variam de 30-75 μM (Yadav et al. 2005).

Uma vez formado no alimento, o metilglioxal pode reagir com outros componentes alimentares causando a perda da qualidade nutricional, além de gerar a produção de outros compostos tóxicos (Ahmed et al. 2004). Embora a concentração de metilglioxal nos alimentos e na água é relativamente baixa, quando ocorre ingestão crônica, alterações causadas pelo metilglioxal tem sido relatadas em animais saudáveis, como a diminuição significativa de GSH no sangue (Ankrah e Appiah-Opong 1999).

As fontes endógenas de metilglioxal incluem reações enzimáticas e não-enzimáticas. As vias enzimáticas compreendem reações catalisadas pela triose fosfato isomerase, citocromo P450, mieloperoxidase e amino oxidase, enquanto que as reações não-enzimáticas ocorrem através da decomposição da diidroxiacetona fosfato, da reação de Maillard, da oxidação do acetol e da peroxidação lipídica (Nemet et al. 2006, Vander Jagt e Hunsaker 2003).

Trioses fosfato, como a diidroxiacetona fosfato e o gliceraldeído-3 fosfato e intermediários da via glicolítica, são uma das formas mais importantes de produção de metilglioxal. A formação de metilglioxal a partir destes compostos pode ocorrer de duas formas: pela eliminação espontânea (não-enzimática) do grupo fosfato ou através da decomposição a partir da triose fosfato isomerase (Pompliano et al. 1990, Richard 1993). Metilglioxal também pode ser formado pela lenta degradação da glicose e dos produtos de Amadori (Thornalley et al. 1999).

Outra fonte endógena de metilglioxal inclui o catabolismo da treonina. A treonina é degradada a aminoacetona, que posteriormente, forma metilglioxal através da enzima amino oxidase sensível à semicarbazida (Lyles e Chalmers 1992). O catabolismo da treonina geralmente produz glicina e acetil-CoA, entretanto, como na cetoacidose diabética grande parte da coenzima A está na forma de acetil-CoA, a treonina será degradada, produzindo aminoacetona (Tressel et al. 1986).

Os corpos cetônicos (acetoacetato e acetona) também podem gerar metilglioxal. O acetoacetato produz metilglioxal mediado pela mieloperoxidase (Aleksandrovskii 1992), enquanto que acetona é convertida a metilglioxal pelo citocromo P450 (Casazza et al. 1984). Estas vias possuem grande relevância, especialmente na cetose e cetoacidose diabética (Nemet et al. 2006). É provável que o metilglioxal seja formado também através do aumento das trioses fosfato causado pela crescente produção de glicerol através da degradação de triglicerídeos (Baynes e Thorpe 2000).

Os destinos do metilglioxal incluem a sua detoxificação por diferentes vias ou a formação de AGEs. Existem quatro vias de detoxificação do metilglioxal: sistema glioxalase, aldose redutase, betaína aldeído desidrogenase e 2-oxoaldeído desidrogenase. O sistema glioxalase (Figura 2) está presente e ativo na maioria dos tecidos, sendo considerado o principal mecanismo de defesa contra a toxicidade do

metilglioxal (Vander Jagt e Hunsaker 2003). O sistema glioxalase é composto por duas enzimas, a glioxalase I e a glioxalase II. A glioxalase I catalisa a formação de S-D-lactoilglutaciona, utilizando GSH nesta reação. A glioxalase II catalisa a hidrólise da S-D-lactoilglutaciona a D-lactato com a regeneração de GSH. A lactato desidrogenase catalisa a conversão de D-lactato em piruvato (Thornalley 1990). Este sistema é limitado pela disponibilidade de GSH, que pode ser encontrada em níveis reduzidos em condições de estresse oxidativo.

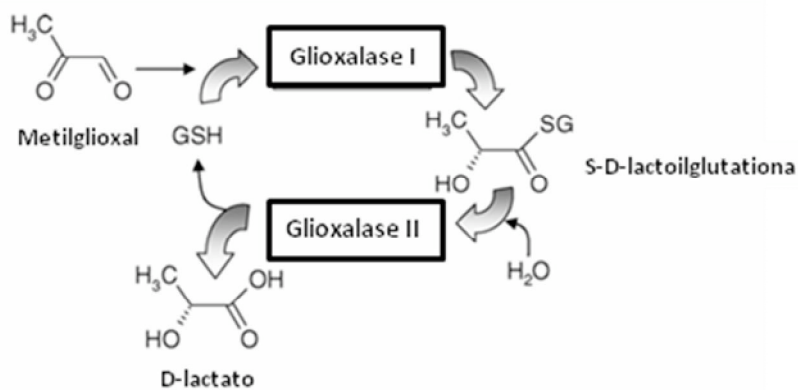


Figura 2. O sistema glioxalase. Adaptado de Kuhla et al. 2007.

A aldose redutase catalisa a redução de uma grande variabilidade de aldeídos, onde o metilglioxal é o melhor substrato fisiológico desta enzima. A distribuição da aldose redutase em tecidos humanos é restrita, sendo que há pequena expressão no fígado (Vander Jagt e Hunsaker 2003). A aldose redutase catalisa a redução de metilglioxal em lactaldeído na presença de GSH e em acetol na ausência de GSH e, após, lactaldeído e acetol são convertidos a 1,2-propanodiol. No entanto, acetol é um substrato muito pobre para a segunda redução. Como acetol pode ser espontaneamente transformado em metilglioxal nas condições característica da diabetes, a redução de metilglioxal pela aldose redutase na ausência de GSH é uma reação indesejável (Vander Jagt et al. 2001).

A betaína aldeído desidrogenase (ALDH9 ou E3) catalisa a oxidação de metilglioxal a piruvato, em uma reação dependente de NAD. A 2-oxoaldeído desidrogenase também catalisa a oxidação de metilglioxal a piruvato, sendo que esta enzima necessita de NAD ou NADP para sua atividade. Embora existam poucas informações sobre a detoxificação de metilglioxal pela 2-oxoaldeído desidrogenase, supõe-se que esta via é relevante na defesa contra a toxicidade deste composto no fígado (Vander Jagt e Hunsaker 2003).

1.2.2 Metilglioxal, Diabetes Mellitus e Doença de Alzheimer

Estudos mostram aumento nos níveis de metilglioxal pós-prandial em pacientes diabéticos (Beisswenger et al. 2001) e uma diminuição significativa nos níveis de metilglioxal em pacientes com pequena oscilação nos níveis de glicose em amostras de sangue e plasma (Nemet et al. 2005). Desta forma, sugeriu-se a possível utilização de metilglioxal como um indicador adicional da regulação da DM. Além disso, foi demonstrado que a ingestão elevada de AGEs foi capaz de aumentar os níveis de metilglioxal no soro (26%), enquanto que uma dieta com pequena ingestão de AGEs provocou uma diminuição (35%) (Uribarri et al. 2003), fato que pode agravar o curso de doenças relacionadas com o metilglioxal, como DM e DA, dependendo da dieta consumida.

Sabe-se que uma redução da capacidade das enzimas glicolíticas que atuam posteriormente a formação de trioses fosfato, particularmente gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Brownlee 2001) e/ou prejuízo nos processos de detoxificação do metilglioxal causam aumento dos níveis deste composto na DM. O metilglioxal, especialmente quando em níveis elevados, pode formar AGEs. Neste contexto, foi

relatado que os AGEs derivados do metilglioxal encontram-se elevados na DM (Shamsi et al. 1998).

Altas concentrações de metilglioxal foram encontradas no fluido cerebrospinal de pacientes com DA e em plasma de indivíduos com DM (Kuhla et al. 2005). Aliado a isso, sabe-se que a atividade do sistema glioxalase está diminuída no envelhecimento e nos estágios intermediário e tardio da DA (Kuhla et al. 2007), fato que pode contribuir para a maior toxicidade do metilglioxal, visto que, deste modo, pode ocorrer um aumento nas concentrações deste aldeído.

Assim, a prevenção da formação de metilglioxal ou o aumento na capacidade de detoxificação poderiam ser um meio de limitar o desenvolvimento de complicações da DM e da DA a longo prazo (Vander Jagt e Hunsaker 2003).

1.3 Astrócitos

Os astrócitos são as células mais abundantes do sistema nervoso central. Atualmente, se sabe que os astrócitos não somente estabelecem a arquitetura estrutural do encéfalo, mas também organizam e participam de suas vias de comunicação e plasticidade, envolvidas na manutenção do funcionamento cerebral normal (Blasko et al. 2004).

Dentre as inúmeras funções exercidas pelos astrócitos pode-se citar: a formação e manutenção da barreira hemato-encefálica (Abbott et al. 2006), a regulação de níveis extracelulares dos íons (Walz 1989), regulação do equilíbrio ácido-base (Koehler et al. 2006), a produção de fatores tróficos (Eriksen e Druse 2001), o suporte energético para os neurônios (Pellerin 2005), a regulação dos níveis de glutamato na sinapse (Bernardinelli et al. 2004), a síntese e liberação de GSH (Shih et al. 2006, Dringen et al.

2000) e a capacidade de funcionar como células imunopotentes (Dong e Benveniste 2001).

Estudos recentes sugerem que os astrócitos podem metabolizar a glicose a lactato e, em seguida, transportá-lo para os neurônios (Pellerin 2005). O glicogênio do cérebro, que é localizado predominantemente em astrócitos, pode servir como um depósito local de glicose para a mobilização, mais tarde, como um substrato energético neuronal. Essas propriedades dos astrócitos sugerem que eles podem reagir cedo à mudanças relacionadas a diabetes no metabolismo da glicose (Lebed et al. 2008).

Além disso, se sabe que dentre os diferentes tipos de células que compõem o sistema nervoso central, os astrócitos são as células que predominantemente expressam e secretam a proteína S100B (Donato 2001). A S100B pode exercer efeitos autócrinos e parácrinos sobre outras células gliais e neurônios, além de ter sido apontada como um provável marcador de dano cerebral (Goncalves et al. 2008).

Foi sugerido que após a ativação, astrócitos se transformariam em células inflamatórias, negligenciando suas funções fisiológicas e, desta forma, contribuindo ativamente com a neurodegeneração. Se esta hipótese for verdadeira, os astrócitos podem se tornar alvos promissores para intervenção terapêutica na DA (Fuller et al. 2010).

Os astrócitos, quando ativados, liberam uma grande variedade de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, óxido nítrico) e de estresse oxidativo (ERO e espécies reativas de nitrogênio), que parecem alterar o metabolismo energético, diminuir a capacidade de captação de glutamato e reduzir o sistema de defesa oxidativo (GSH). Estes sinais de disfunção astrogliar relativos à três funções essenciais dos astrócitos têm sido observados em diversos estudos post-mortem e *in vivo* da DA (Fuller et al. 2010).

Estudos mostram que a captação de glicose no encéfalo está prejudicada em pacientes com DA (Freemantle et al. 2006) e, pelo menos em parte, este prejuízo é causado por uma redução da captação de glicose astrogliar (Alexander et al. 2002). Além de alterações relacionadas à glicose, parece que a captação de glutamato astrocitária e liberação de glutamina também podem ser afetadas na DA (Fuller et al. 2010). Um estudo mostra um prejuízo no transporte de glutamato, devido a perda do transportador de aminoácido excitatório 2 (EAAT2) (que é expresso principalmente por astrócitos, também chamado GLT1) e defeitos no transporte de glutamato (Li et al. 1997). Assim, os astrócitos podem perder a capacidade neuroprotetora de controle da concentração de glutamato extracelular, contribuindo para a lesão neuronal na DA.

O fornecimento de GSH e de precursores de GSH aos neurônios também parece estar afetado na DA e este fornecimento é, em grande parte, dependente do adequado funcionamento dos astrócitos. Na DA há um aumento dos marcadores de estresse oxidativo e redução da disponibilidade de GSH (Calabrese et al. 2006).

1.3.1 Glioma C6

O glioma C6 constitui-se como uma linhagem neural, apresentando características de astrócitos (Parker et al. 1980) a partir da centésima passagem de cultivo (de Souza et al. 2009). A expressão das proteínas gliais GFAP e S100B confirma o seu caráter astrocitário (Benda et al. 1971). Por este motivo, a linhagem C6 pode ser utilizada para investigação de características bioquímicas e metabólicas que envolvam funções astrocíticas (Mangoura et al. 1989, Quincozes-Santos et al. 2010).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos do metilglioxal a curto (1 e 3 horas) e longo prazo (24 horas) sobre o metabolismo energético, parâmetros de estresse oxidativo e parâmetros astrogliais em células de glioma C6.

Objetivos específicos

- Investigar o efeito do metilglioxal sobre a morte e viabilidade celular;
- Avaliar a formação de espécies reativas e conteúdo de GSH intra e extracelular através da exposição ao metilglioxal;
- Analisar o efeito do metilglioxal sobre a captação de glutamato e secreção da proteína S100B, que são parâmetros astrogliais específicos;
- Verificar diferentes parâmetros metabólicos, como captação de glicose, oxidação e conversão de glicose a lipídios, oxidação, conversão a lipídios e síntese protéica a partir de glicina, além de oxidação de lactato em células astrogliais C6 expostas ao metilglioxal;
- Estudar a atividade do sistema glioxalase, bem como quantificar o conteúdo de AGEs produzido a partir da exposição das células ao metilglioxal.

CAPÍTULO 1

**Methylglyoxal alters glyoxalase system activity and glucose metabolism
in C6 astroglial cells**

Submetido ao periódico Neurochemistry International

Manuscript Number:

Title: Methylglyoxal alters glyoxalase system activity and glucose metabolism in C6 astroglial cells

Article Type: Research Article

Keywords: C6 astroglial cells; glucose metabolism; glyoxalase system; methylglyoxal

Corresponding Author: Dr Carlos-Alberto Goncalves, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Fernanda Hansen

Order of Authors: Fernanda Hansen; Daniela F de Souza; Simone L Silveira; Ana Lucia Hoefel; Julia B Fontoura; Ana Carolina Tramontina; Marina C Leite; Marcos Luiz S Perry; Carlos-Alberto Goncalves, MD, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Methylglyoxal is a dicarbonyl compound, physiologically produced by enzymatic and non-enzymatic reactions. This compound can lead to cytotoxicity, which is mainly related to Advanced Glycation End Products (AGEs) formation and alteration of the glyoxalase system depletion. Methylglyoxal and AGEs are involved in the pathogenesis of Neurodegenerative Diseases (ND) and, in these situations, can cause impairment of energetic metabolism. The aim of this study was evaluate the effect of methylglyoxal exposure, over short (1 and 3 h) and long term (24 h) periods, on the glyoxalase system, glucose, glycine and lactate metabolism in C6 astroglial cells. Data indicate that methylglyoxal (400 μ M) decreases glyoxalase I and II activity only over 24 h. The glucose uptake and glucose oxidation to CO₂ increased in 1 h and the conversion of glucose to lipids increased at 3 h. In addition, glycine oxidation to CO₂ and conversion of glycine to lipids increased at 1 h, whereas the incorporation of glycine in proteins decreased at 1 and 3 h. Lactate oxidation was not modified by methylglyoxal exposure. These data provide evidence that methylglyoxal may impair energy metabolism and can damage the glyoxalase activity. In periods of increase of methylglyoxal exposure, such alterations could be exacerbated, leading to greater increase in intracellular methylglyoxal and, thus, contributing to trigger and/or worsen ND.

March 14th, 2011

Neurochemistry International

Editorial Office/Editors-in Chief

Dr Sylvester Vizi & Dr Michael Robinson

Dear Editors

Please find enclosed the manuscript titled "**Methylglyoxal alters glyoxalase system activity and glucose metabolism in C6 astroglial cells**", by Hansen et al., that we wish to be considered for publication in the Neurochemistry International. A list of 3 potential referees is in attachment.

We hope that the Editorial Board Neurochemistry International will find the manuscript of interest.

Sincerely yours,

Carlos Alberto Gonçalves, MD, PhD

Departamento de Bioquímica, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ramiro Barcelos, 2600-anexo, Porto Alegre, Brasil, 90035-003

Telephone: +55 51 33085567/Fax: +55 51 33085539

E-mail: casg@ufrgs.br

Highlights

1. Methylglyoxal production is increased in diabetes mellitus and Alzheimer's disease
2. Methylglyoxal inhibits the glyoxalase system in astroglial cells
3. This compound favors glucose utilization to lipid synthesis
4. Such alterations could trigger and/or worsen neurodegenerative diseases

Methylglyoxal alters glyoxalase system activity and glucose metabolism in C6 astroglial cells

Fernanda Hansen¹, Daniela Fraga de Souza¹, Simone da Luz Silveira¹, Ana Lúcia Hoefel¹, Júlia Bijoldo Fontoura², Ana Carolina Tramontina¹, Marina Concli Leite¹, Marcos Luiz Santos Perry¹†, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves¹

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

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil

† In memoriam

Corresponding author: Carlos Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Ramiro Barcelos, 2600-Anexo
90035-003
Porto Alegre, RS, Brazil
Telephone: +55 51 33085567
Fax: +55 51 33085539
casg@ufrgs.br

Abstract

Methylglyoxal is a dicarbonyl compound, physiologically produced by enzymatic and non-enzymatic reactions. This compound can lead to cytotoxicity, which is mainly related to Advanced Glycation End Products (AGEs) formation and alteration of the glyoxalase system depletion. Methylglyoxal and AGEs are involved in the pathogenesis of Neurodegenerative Diseases (ND) and, in these situations, can cause impairment of energetic metabolism. The aim of this study was evaluate the effect of methylglyoxal exposure, over short (1 and 3 h) and long term (24 h) periods, on the glyoxalase system, glucose, glycine and lactate metabolism in C6 astroglial cells. Data indicate that methylglyoxal (400 μ M) decreases glyoxalase I and II activity only over 24 h. The glucose uptake and glucose oxidation to CO₂ increased in 1 h and the conversion of glucose to lipids increased at 3 h. In addition, glycine oxidation to CO₂ and conversion of glycine to lipids increased at 1 h, whereas the incorporation of glycine in proteins decreased at 1 and 3 h. Lactate oxidation was not modified by methylglyoxal exposure. These data provide evidence that methylglyoxal may impair energy metabolism and can damage the glyoxalase activity. In periods of increase of methylglyoxal exposure, such alterations could be exacerbated, leading to greater increase in intracellular methylglyoxal and, thus, contributing to trigger and/or worsen ND.

Keywords: C6 astroglial cells; glucose metabolism; glyoxalase system; methylglyoxal

1. Introduction

Advanced glycation end products (AGEs) play an important role in the pathogenesis of diabetes, aging and Neurodegenerative Diseases (ND), such as Parkinson's and Alzheimer's disease (AD) (Goldin et al., 2006, Ramasamy et al., 2005). It was known that excess levels of free radicals and reactive carbonyl compounds are also involved in the pathogenesis of AD (Munch et al., 1994, Munch et al., 1997). Among the many reactive carbonyl compounds and AGEs precursors, methylglyoxal has been suggested to be a major source of intracellular AGEs (de Arriba et al., 2007).

Methylglyoxal is a dicarbonyl compound that is physiologically produced by various metabolic pathways (Phillips and Thornalley, 1993), including from dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde-3-phosphate during glycolysis (Krautwald and Munch, 2010) and from processes involved in glycine and threonine catabolism (Vander Jagt and Hunsaker, 2003). High levels of methylglyoxal occur when the concentrations of their precursors are elevated, such as in triosephosphate deficiency, hyperglycemia and impaired glucose utilization (Ahmed et al., 2003). Glyoxalase is an intracellular cytosolic system composed of the sequential reaction of two enzymes, glyoxalase I and glyoxalase II, which uses glutathione (GSH) as a co-factor and is responsible for α -oxoaldehyde detoxification, such as methylglyoxal (Abordo et al., 1999).

Increased levels of methylglyoxal are present in the cerebrospinal fluid of patients affected by ND and in the plasma of diabetes patients (Kuhla et al., 2005). Although physiological levels of methylglyoxal have not yet been established, it has been proposed that plasma methylglyoxal levels may be poorly controlled in diabetic patients, reaching about 400 $\mu\text{mol/l}$ (Lapolla et al., 2005), and that the concentration of

methylglyoxal could be five to seven times higher in the cerebrospinal fluid of AD patients than in the plasma (Kuhla et al., 2005).

Studies with AD patients showed an impairment in brain glucose uptake (Freemantle et al., 2006) and this finding is caused, at least in part, by a loss of astroglial glucose uptake (Alexander et al., 2002). The disrupted glucose metabolism in the brain seems to precede the appearance of pathological hallmarks, such as amyloid plaques and neurofibrillary tangles (Fuller et al., 2010). Astroglial cells play critical roles in brain metabolism, performing diverse functions such as glycogen synthesis, glutamate uptake, cholesterol and glutathione synthesis (Fuller et al., 2010, Hertz et al., 2007). The appropriate functioning of these pathways in astrocytes is essential for the survival and function of neurons, inasmuch as the impairment of these pathways can lead to ND (Hertz et al., 2007). The C6 lineage cells are an astrocyte-like cell line that is widely used to study biochemistry and metabolic characteristics of astrocyte functions (Baber and Haghghat, 2010, Mangoura et al., 1989, Quincozes-Santos et al., 2008, Quincozes-Santos et al., 2009, Quincozes-Santos et al., 2010).

Assuming that methylglyoxal can disrupt the energetic metabolism in rat brain slices and in neuron cultures (de Arriba et al., 2007, Schmidt et al., 2010), the aim of this study was to investigate the effect of this compound on glyoxalase I and II activity, glucose uptake, glucose, glycine and lactate metabolism in C6 astroglial cells during short (1 h and 3 h) and long term (24 h) methylglyoxal exposure.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Methylglyoxal, S-lactoylglutathione, glutathione (GSH), cytochalasin B and cell culture materials were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's

modified Eagle's medium (DMEM) was purchased from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA) and fetal bovine serum (FBS) was obtained from Cultilab (Campinas, SP, Brazil). [U-¹⁴C]glycine (100 mCi/mmol), D-[U-¹⁴C]glucose (250–360 mCi/mmol), L-[U-¹⁴C]lactate (56–186 mCi/mmol) and D-[3-³H] glucose (20 Ci/mmol) were from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). Chloroform, formic acid and methanol were obtained from Merck (Porto Alegre, Brazil). Hyamine hydroxide was purchased from J.T. Baker Chemical Company (Phillisburg, NJ, USA). All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

2.2 C6 astroglial cell culture

The C6 glioma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Late passage cells (i.e. after at least 100 passages) were seeded on 24-well plates or in flasks at densities of 10^4 cells/well, and cultured in DMEM (pH 7.4) supplemented with 5% fetal bovine serum, 2.5 mg/mL Fungizone and 100 U/L gentamicin in 5% CO₂/95% air at 37°C. After cells had reached confluence, the culture medium was replaced by DMEM without serum in the absence or presence of methylglyoxal (at 100 μM and 400 μM) (de Souza et al., 2009).

2.3 Propidium iodide uptake assay

Cells were treated with methylglyoxal concomitantly with 7.5 μM propidium iodide (PI) and incubated for 1 h or 24 h. Cells were viewed with a Nikon inverted microscope with a TE-FM Epi-Fluorescence accessory; images were transferred to a computer with a digital camera. All images are representative fields from at least three experiments, carried out in triplicate. Optical density was determined with the Optiquant

version 02.00 software (Packard Instrument Company) and positive cell counts for PI were measured (Leite et al., 2009).

2.4 Cell extract preparation for enzymatic activity assays

The astroglial cells were lysed and homogenized in sodium phosphate buffer, pH 7.4. Cell homogenates were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4°C and the supernatant was used for enzymatic activities and protein content measurements.

2.5 Glyoxalase I activity assay

Glyoxalase I activity was assayed according to (Mannervik et al., 1981), with some modifications. The assay was carried out in 96-well microplates using a microplate spectrophotometer (UV Star - Greiner). The reaction mixture (200 µL/well) contained 50 mM sodium-phosphate buffer pH 7.2, 2 mM methylglyoxal (MG) and 1 mM glutathione (GSH) (pre-incubated for 30 min at room temp). Protein from the sample (10–20 µg per well) was added to the buffer. The formation of S-(D)-lactoylglutathione was monitored at 240 nm for 15 min at 25°C. A unit of glyoxalase I activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 µmol of S-(D)-lactoylglutathione per minute. Specific activity is expressed in milliunits per miligram of protein.

2.6 Glyoxalase II activity assay

Glyoxalase II activity was assayed according to (Oray and Norton, 1982), with some modifications. The assay was carried out in 96-well microplates using a microplate spectrophotometer (UV Star - Greiner). The reaction mixture (200 µL/well) contained 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 0.5 mM S-

lactoylglutathione. Protein from the sample (15–30 µg per well) was added to the buffer. The disappearance of S-lactoylglutathione was monitored at 240 nm for 15 min at 30°C. A unit of glyoxalase II activity is defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 µmol of S-(D)-lactoylglutathione per minute. Specific activity is expressed in milliunits per milligram of protein.

2.7 Glucose uptake assay

Glucose uptake was performed, as previously described (Pellerin and Magistretti, 1994), with some modifications. Briefly, C6 glioma cells were incubated at 35°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄·7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, and 5.55 glucose, adjusted to pH 7.2. The assay was started by the addition of 0.1 µCi/well D-[3-³H] glucose. The incubation was stopped after 15 min by removing the medium and rinsing the cells twice with ice-cold HBSS. The cells were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Glucose uptake was calculated by subtracting the non-specific uptake, obtained by the glucose transporter inhibitor, cytochalasin B (25 µM), from the total uptake in order to obtain the specific uptake. Results (nmol/mg protein/min) were expressed as a percentage of the control.

2.8 Biosynthesis and oxidation to CO₂ assays in radio-labeled substrates

For the measurement of lipid or protein synthesis and CO₂ production, C6 astroglial cells were incubated in 1.0 mL Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) pH 7.4, containing either (i) 5.5 mM D-glucose + 0.2 µCi D-[U-¹⁴C]glucose; (ii) 5.5 mM D-glucose + 0.4 mM glycine + 0.3 µCi [U-¹⁴C] glycine; (iii) 5.0 mM L-

lactate + 5.5 mM D-glucose + 0.2 μCi L-[U- ^{14}C]lactate; (iv) 10.0 mM glucose + 5.0 mM L-lactate + 0.2 μCi L-[U- ^{14}C]lactate; (v) 10.0 mM L-lactate + 5.5 mM D-glucose + 0.2 μCi L-[U- ^{14}C]lactate. Before incubation, the reaction medium was gassed with O_2 for 30 s. Flasks were sealed with rubber caps and parafilm. Glass center wells containing a folded 60 mm/4 mm piece of Whatman 3 filter paper were hung from the stoppers. C6 astroglial cells were incubated at 37°C for 1 h and 3 h in a Dubnoff metabolic shaker (60 cycles/min), according to the method of (Dunlop et al., 1975, Schmidt et al., 2010). Incubations were stopped by adding 0.20 mL 2 M HCl through the rubber cap. Subsequently, 0.10 mL of 2 M sodium hydroxide was injected into the central wells. The flasks were shaken for an additional 30 min at 37°C to trap CO_2 . Afterwards, the contents of the central well were transferred to vials and assayed for CO_2 radioactivity in a liquid-scintillation counter. Glial cells were lysed and the flask contents transferred to tubes. After centrifugation, the precipitate was washed once with 50% TCA and the twice with 10% TCA, and lipids were extracted with chloroform:methanol (2:1). The chloroform/methanol phase was evaporated in vials and radioactivity was measured. The resulting precipitate was dissolved in concentrated formic acid and radioactivity was measured. This radioactivity represents the protein synthesis from amino acids. All the results are expressed in relation to the initial specific activity of the incubation medium.

2.9 Protein determination

Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard (Lowry et al., 1951).

2.10 Statistical Analysis

Data are reported as mean \pm standard error and were analyzed by Student's *t*-test. Significance was considered when $p < 0.05$. All analyses were carried out in a PC-compatible computer by SPSS software.

3. Results

3.1 Methylglyoxal exposure did not affect astroglial viability

Initially we evaluated the effect of methylglyoxal, at two concentrations (100 and 400 μM), on cell viability based on the propidium iodide (PI) uptake assay. Cells were exposed to methylglyoxal in serum-free medium for 24 h. There were no significant changes in PI incorporation between control and methylglyoxal exposed cells in 1 and 24 h (Fig. 1), evaluated either through measurement of fluorescence intensity or positive cell counting for PI.

3.2 Methylglyoxal inhibited the glyoxalase system in astroglial cells

Glyoxalase I and II, the main enzymes involved in methylglyoxal detoxification, were measured (Fig. 2 and 3, respectively). Methylglyoxal exposure (at 400 μM) did not alter the activity of either enzyme after 1 h of incubation, however, at 24 h we found a significant decrease in the activity of glyoxalase I (about 19%) and glyoxalase II (about 13%).

3.3 Methylglyoxal altered the glucose metabolism in astroglial cells

In order to investigate whether methylglyoxal affected glucose metabolism, we measured glucose uptake, glucose oxidation (to CO_2) and glucose conversion to lipid. In C6 astroglial cells, 400 μM methylglyoxal increased glucose uptake during the first hour of incubation (about 31%). However, at 24 h, the glucose uptake was not

significantly different from that of the control (Fig. 4). In parallel, we also observed a transitory increment (about 106%) of the oxidation of glucose to CO₂ at 1 h of incubation (Fig. 5A). Lipid synthesis from labeled glucose (Fig. 5B) was not increased by methylglyoxal at 1 h, however, synthesis was found to be increased later on at 3 h (about 76%).

3.4 Methylglyoxal also altered glycine metabolism in astroglial cells, but not lactate metabolism

We then evaluated whether the changes that were observed in glucose metabolism could also be observed with other energetic substrates: glycine and lactate. Glycine oxidation (to CO₂) and conversion of glycine to lipid and protein were determined. Methylglyoxal exposure caused an increase in the oxidation of glycine to CO₂ at 1 h (46%), but, similarly to glucose oxidation, this increase was observed at 3 h (Fig. 6A). Moreover, we observed a transitory increment in lipid synthesis from glycine at 1 h of incubation (45%) (Fig. 6B). However, when we measured protein synthesis from glycine, in C6 cells exposed to 400 μM methylglyoxal, a decrease was observed at 1 h (68%) and 3 h (61%) (Fig. 6C).

The oxidation of lactate to CO₂ was not modified in presence of methylglyoxal at 1 h (Fig. 7) or 3 h (data not shown). We also evaluated lactate oxidation in C6 astroglial cells exposed to methylglyoxal by observing changes in the glucose/lactate ratio (1/2 or 2/1). Again, under both conditions, no changes in lactate oxidation were observed (data not shown).

4. Discussion

Our results show that methylglyoxal did not alter the incorporation of propidium iodide in glial cells until 24 h of exposure (Fig. 1). These findings indicate that, at these concentrations, methylglyoxal did not affect the viability of C6 astroglial cells until at least 24 h. Therefore, we chose 400 μ M methylglyoxal to evaluate the effect on other metabolic parameters. In addition, cell viability also was confirmed by MTT reduction assay (F. Hansen, unpublished results).

The glyoxalase system has an essential role in methylglyoxal detoxification (Abordo et al., 1999). When this system is impaired, intracellular methylglyoxal accumulates with consequent increases in cytotoxicity, which can also lead to an increase in AGEs formation (Kuhla et al., 2006, Kuhla et al., 2007). In C6 astroglial cells, methylglyoxal impaired glyoxalase I and II activity at 24 h of incubation (Fig. 2B and 3B, respectively). These data are in accordance with other studies that show that the glyoxalase system decreases during aging (Krautwald and Munch, 2010, Kuhla et al., 2007) and in neuronal cells exposed to methylglyoxal (Amicarelli et al., 2003, Di Loreto et al., 2008). However, increases have been observed in the expression and activity of the glyoxalase system during the early stages of AD (Kuhla et al., 2007). Moreover, a decrease in the expression and activity of glyoxalase has been reported in the middle and late stages of AD (Kuhla et al., 2007).

It has been proposed that age-related diseases emerge when cells cannot control the formation of aldehydes and/or cannot abolish the negative effect of methylglyoxal on cell metabolism (Dmitriev and Titov, 2010). In this context, we investigated whether glucose metabolism could be altered in C6 astroglial cells exposed to methylglyoxal. In fact, the metabolism of glucose was modified by methylglyoxal exposure. Methylglyoxal caused a transient increase in glucose uptake and, probably, as a consequence, increased the oxidation of glucose to CO₂ at 1 h. These effects

disappeared by 24 h and 3 h, respectively. The conversion of glucose to lipids increased at 3 h of methylglyoxal exposure. Therefore, we may suppose that, at this time, glucose may be used for the synthesis of lipids. However, it is not known whether this augmentation in the conversion of glucose to lipids is transitory, due to technical difficulties in taking this measurement at 24 h.

In accordance with our findings on glucose metabolism, methylglyoxal (400 μM) is known to reduce ATP levels and mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y neuroblastoma cells at 24 h (de Arriba et al., 2007), which could indicate an impairment in energy production and may be related to decrease in glucose uptake at 24 h. However, another study demonstrates that glyoxal does not alter the oxidation of glucose to CO_2 at 1 h in the brain slices of young rats (Schmidt et al., 2010).

It is known that astrocytes play an essential role in the clearance of glutamate from the synaptic cleft and that glucose and glutamate metabolism are linked (Hertz et al., 2007, Pellerin and Magistretti, 1994). In this context, an increase in glutamate uptake was observed at 1 h after methylglyoxal exposure and this effect was transitory, inasmuch as a decrease in glutamate uptake was observed at 24 h in C6 glial cells (F. Hansen, unpublished data). These data may help to explain the increase in glucose metabolism at 1 h, since a higher demand of ATP is required due to the activation of Na^+/K^+ ATPase, linked to Na^+ -dependent glutamate uptake (Pellerin and Magistretti, 1994, 1996).

Glycine is another substrate used by astroglial cells in many metabolic pathways. Astrocytes can degrade glycine through the glycine cleavage system, also known as glycine synthase, which produces carbon dioxide, ammonia and methylene tetrahydrofolate, and can generate serine through the serine hydroxymethyltransferase, and, in turn, produce serine in a reversible reaction (Dringen and Hamprecht, 1996,

Gundersen et al., 2005). When glycine is converted to serine by hydroxymethyltransferase, serine sequentially produces pyruvate, acetyl-CoA plus CO₂, and finally neutral lipids and CO₂ (dos Santos Fagundes et al., 2001). Furthermore, glycine is also used for the synthesis of creatine and tripeptide glutathione (GSH) (Dringen et al., 1998). Our results show that methylglyoxal increases the oxidation of glycine to CO₂ and lipid synthesis at 1 h, but it decreases protein synthesis at 1 and 3 h (Fig. 6).

The increase in the glycine oxidation and lipid synthesis may indicate a short-term effect caused by the possible activation of the glycine synthase and serine hydroxymethyltransferase enzymes, respectively, which could be generated by an increment in glycine uptake by glial cells. Moreover, the damage caused by methylglyoxal during the incorporation of glycine in proteins may help to explain a probable reduction in glutathione content in C6 astroglial cells, which has been reported in several studies (Amicarelli et al., 2003, Di Loreto et al., 2008). This finding is related to the decreased glyoxalase I and II activity, which was observed only at 24 h of methylglyoxal exposure (Fig. 2B).

Methylglyoxal did not alter the oxidation of lactate to CO₂ at 1 h (Fig. 7) nor at 3 h (data not shown) where glucose and lactate were present at same concentration (5 mM). We also evaluated whether different glucose/lactate ratios (1/2 or 2/1) could affect lactate oxidation in C6 astroglial cells exposed to methylglyoxal, as the astrocytes have a high glycolytic flux and, therefore, competition could occur between the two energetic substrates, lactate and glucose (Bouzier et al., 1998, Hertz et al., 2007). Again, methylglyoxal did not change lactate oxidation under these conditions (data not shown). A previous study showed that glyoxal did not modify the oxidation of lactate to CO₂ in brain slices of young rats in 1 h (Schmidt et al., 2010).

In summary, our data indicate that methylglyoxal modifies the metabolism of glucose and glycine in C6 astroglial cells during short-term exposure, but changes in the glyoxalase system only occur during long-term exposure. These data provide evidence that methylglyoxal may impair energy metabolism and can damage the glyoxalase activity. In periods of increase of methylglyoxal exposure, these alterations could be exacerbated, since a greater amount of methylglyoxal would be found intracellularly. Metabolic alterations caused by methylglyoxal in the C6 astroglial cell can impair neuronal functions and these alterations could be related to ND.

Acknowledgements

We would like to thank Ms. Gisele Souza for technical support with cell culture.

Role of the funding source

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection. The funding sources had no involvement in study design, in the collection, analysis and interpretation of data neither in the writing of the report and in the decision to submit the paper for publication.

References

- Abordo, E.A., Minhas, H.S., Thornalley, P.J., 1999. Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 58, 641-648.
- Ahmed, N., Battah, S., Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Horanyi, M., Baroti, K., Hollan, S., Thornalley, P.J., 2003. Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1639, 121-132.
- Alexander, C.L., Fitzgerald, U.F., Barnett, S.C., 2002. Identification of growth factors that promote long-term proliferation of olfactory ensheathing cells and modulate their antigenic phenotype. *Glia.* 37, 349-364.
- Amicarelli, F., Colafarina, S., Cattani, F., Cimini, A., Di Ilio, C., Ceru, M.P., Miranda, M., 2003. Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 856-871.
- Baber, Z., Haghghat, N., 2010. Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. *Metab. Brain Dis.* 25, 413-418.
- Bouzier, A.K., Voisin, P., Goodwin, R., Canioni, P., Merle, M., 1998. Glucose and lactate metabolism in C6 glioma cells: evidence for the preferential utilization of lactate for cell oxidative metabolism. *Dev. Neurosci.* 20, 331-338.
- de Arriba, S.G., Stuchbury, G., Yarin, J., Burnell, J., Loske, C., Munch, G., 2007. Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells--protection by carbonyl scavengers. *Neurobiol. Aging.* 28, 1044-1050.
- de Souza, D.F., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L.S., Rigo, M.M., Gottfried, C., Leal, R.B., Goncalves, C.A., 2009. S100B secretion is

- stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J. Neuroimmunol.* 206, 52-57.
- Di Loreto, S., Zimmitti, V., Sebastiani, P., Cervelli, C., Falone, S., Amicarelli, F., 2008. Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 245-257.
- Dmitriev, L.F., Titov, V.N., 2010. Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 9, 200-210.
- dos Santos Fagundes, I., Rotta, L.N., Schweigert, I.D., Valle, S.C., de Oliveira, K.R., Huth Kruger, A., Souza, K.B., Souza, D.O., Perr, M.L., 2001. Glycine, serine, and leucine metabolism in different regions of rat central nervous system. *Neurochem. Res.* 26, 245-249.
- Dringen, R., Hamprecht, B., 1996. Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J. Neurochem.* 67, 1375-1382.
- Dringen, R., Verleysdonk, S., Hamprecht, B., Willker, W., Leibfritz, D., Brand, A., 1998. Metabolism of glycine in primary astroglial cells: synthesis of creatine, serine, and glutathione. *J. Neurochem.* 70, 835-840.
- Dunlop, D.S., van Elden, W., Lajtha, A., 1975. Optimal conditions for protein synthesis in incubated slices of rat brain. *Brain Res.* 99, 303-318.
- Freemantle, E., Vandal, M., Tremblay-Mercier, J., Tremblay, S., Blachere, J.C., Begin, M.E., Brenna, J.T., Windust, A., Cunnane, S.C., 2006. Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 75, 213-220.

- Fuller, S., Steele, M., Munch, G., 2010. Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease--do they neglect their neurosupportive roles? *Mutat. Res.* 690, 40-49.
- Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M., Creager, M.A., 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 114, 597-605.
- Gundersen, R.Y., Vaagenes, P., Breivik, T., Fonnum, F., Opstad, P.K., 2005. Glycine--an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 49, 1108-1116.
- Hertz, L., Peng, L., Dienel, G.A., 2007. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 219-249.
- Krautwald, M., Munch, 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.
- Kuhla, B., Luth, H.J., Haferburg, D., Boeck, K., Arendt, T., Munch, G., 2005. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 211-216.
- Kuhla, B., Luth, H.J., Haferburg, D., Weick, M., Reichenbach, A., Arendt, T., Munch, G., 2006. Pathological effects of glyoxalase I inhibition in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 83, 1591-1600.
- Kuhla, B., Boeck, K., Schmidt, A., Ogunlade, V., Arendt, T., Munch, G., Luth, H.J., 2007. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Aging.* 28, 29-41.

- Lapolla, A., Reitano, R., Seraglia, R., Sartore, G., Ragazzi, E., Traldi, P., 2005. Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 685-690.
- Leite, M.C., Galland, F., de Souza, D.F., Guerra, M.C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2009. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J. Neurosci. Res.* 87, 2439-2446.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mangoura, D., Sakellaridis, N., Jones, J., Vernadakis, A., 1989. Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem. Res.* 14, 941-947.
- Mannervik, B., Aronsson, A.C., Marmstal, E., Tibbelin, G., 1981. Glyoxalase I (rat liver). *Methods Enzymol.* 77, 297-301.
- Munch, G., Taneli, Y., Schraven, E., Schindler, U., Schinzel, R., Palm, D., Riederer, P., 1994. The cognition-enhancing drug tenilsetam is an inhibitor of protein crosslinking by advanced glycosylation. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect. 8*, 193-208.
- Munch, G., Thome, J., Foley, P., Schinzel, R., Riederer, P., 1997. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 23, 134-143.
- Oray, B., Norton, S.J., 1982. Glyoxalase II from mouse liver. *Methods Enzymol.* 90 Pt E, 547-551.

- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10625-10629.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1996. Excitatory amino acids stimulate aerobic glycolysis in astrocytes via an activation of the Na⁺/K⁺ ATPase. *Dev. Neurosci.* 18, 336-342.
- Phillips, S.A., Thornalley, P.J., 1993. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* 212, 101-105.
- Quincozes-Santos, A., Abib, R.T., Leite, M.C., Bobermin, D., Bambini-Junior, V., Goncalves, C.A., Riesgo, R., Gottfried, C., 2008. Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. *Mol. Cell Biochem.* 314, 59-63.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Kleinkauf-Rocha, J., Souza, D.O., Riesgo, R., Goncalves, C.A., Gottfried, C., 2009. Atypical neuroleptic risperidone modulates glial functions in C6 astroglial cells. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 33, 11-15.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Tonial, R.P., Bambini-Junior, V., Riesgo, R., Gottfried, C., 2010. Effects of atypical (risperidone) and typical (haloperidol) antipsychotic agents on astroglial functions. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 260, 475-481.
- Ramasamy, R., Vannucci, S.J., Yan, S.S., Herold, K., Yan, S.F., Schmidt, A.M., 2005. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology.* 15, 16R-28R.

Schmidt, B., de Assis, A.M., Battu, C.E., Rieger, D.K., Hansen, F., Sordi, F., Longoni, A., Hoefel, A.L., Farina, M., Goncalves, C.A., Souza, D.O., Perry, M.L., 2010. Effects of glyoxal or methylglyoxal on the metabolism of amino acids, lactate, glucose and acetate in the cerebral cortex of young and adult rats. *Brain Res.* 1315, 19-24.

Vander Jagt, D.L., 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.

Figure legends

Fig. 1. *Effect of methylglyoxal on membrane integrity.* C6 astroglial cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) in DMEM without serum for 1 h and 24 h in the presence of propidium iodide (PI). Nuclear fluorescent staining is shown at 1 h under basal conditions (A) and at 24 h (B), methylglyoxal exposure at 1 h (C), and at 24 h (D). Values of positive cell counts for PI/field are expressed as the means \pm standard error of four independent experiments performed in triplicate. Scale bar = 100 μ m.

Fig. 2. *Methylglyoxal alters glyoxalase I activity.* C6 astroglial cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h (A) and 24 h (B) in DMEM without serum. Data are expressed as the means \pm standard error of five independent experiments performed in quintuplicate. * Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Fig. 3. *Methylglyoxal affects glyoxalase II activity.* C6 astroglial cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h (A) and 24 h (B) in DMEM without serum. Data are expressed as the means \pm standard error of five independent experiments performed in quintuplicate. * Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Fig. 4. *Influence of methylglyoxal on glucose uptake.* C6 glioma cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h (A) and 24 h (B) in DMEM without serum. Data are expressed as percentage of control for five independent experiments performed in quadruplicate. Percentage of control corresponds to 12.8 nmol/mg protein/min at 1 h

and 19.9 nmol/mg protein/min at 24 h in DMEM without serum. * Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

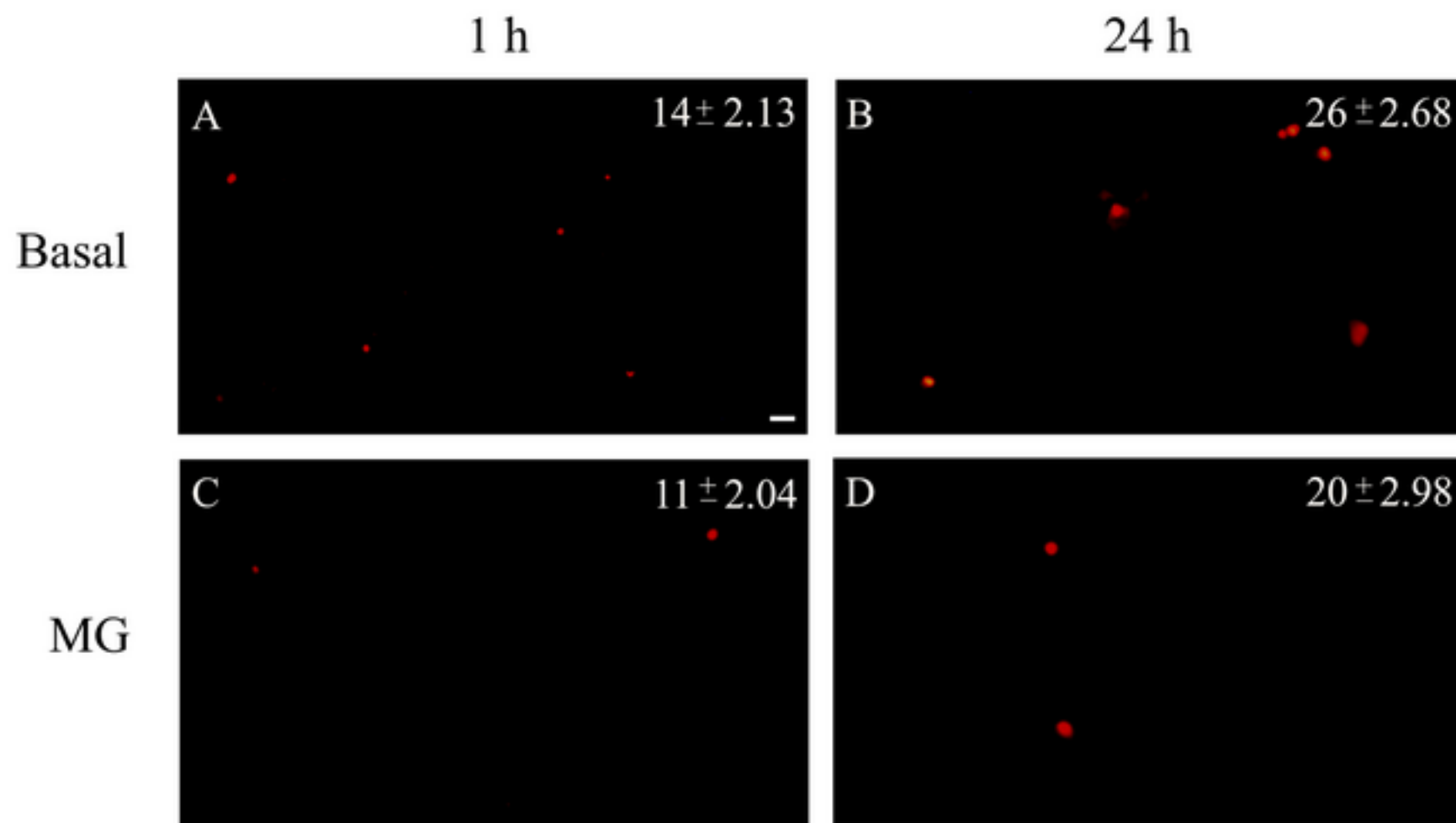
Fig. 5. *Effect of methylglyoxal on glucose metabolism.* C6 cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h and 3 h in DMEM without serum. Glucose oxidation to CO₂ (A) and conversion to lipids (B) were determined. Glucose oxidation is expressed as pmol of substrate oxidized to CO₂/mg protein and glucose conversion to lipids is expressed as pmol of glucose converted in lipids/mg protein. Data are expressed as the means \pm standard error of three independent experiments performed in quadruplicate. * Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Fig. 6. *Effect of methylglyoxal on glycine metabolism.* C6 cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h and 3 h in DMEM without serum. Glycine oxidation to CO₂ (A), conversion to lipids (B) and incorporation in protein (C) were measured. Glycine oxidation is expressed as pmol of amino acid oxidized to CO₂/mg protein. Glycine conversion to lipids and incorporation in proteins are expressed as pmol of glycine converted in lipids/mg protein and pmol of amino acid incorporated in protein/mg protein, respectively. Data are expressed as the means \pm standard error of three independent experiments performed in quadruplicate. * Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Fig. 7. *Lactate oxidation to CO₂ is not modified by methylglyoxal exposure.* C6 astroglial cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h in DMEM without serum. Lactate oxidation is expressed as pmol of substrate oxidized to CO₂/mg protein. Data are expressed as the means \pm standard error of five independent experiments

performed in quadruplicate. * Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)



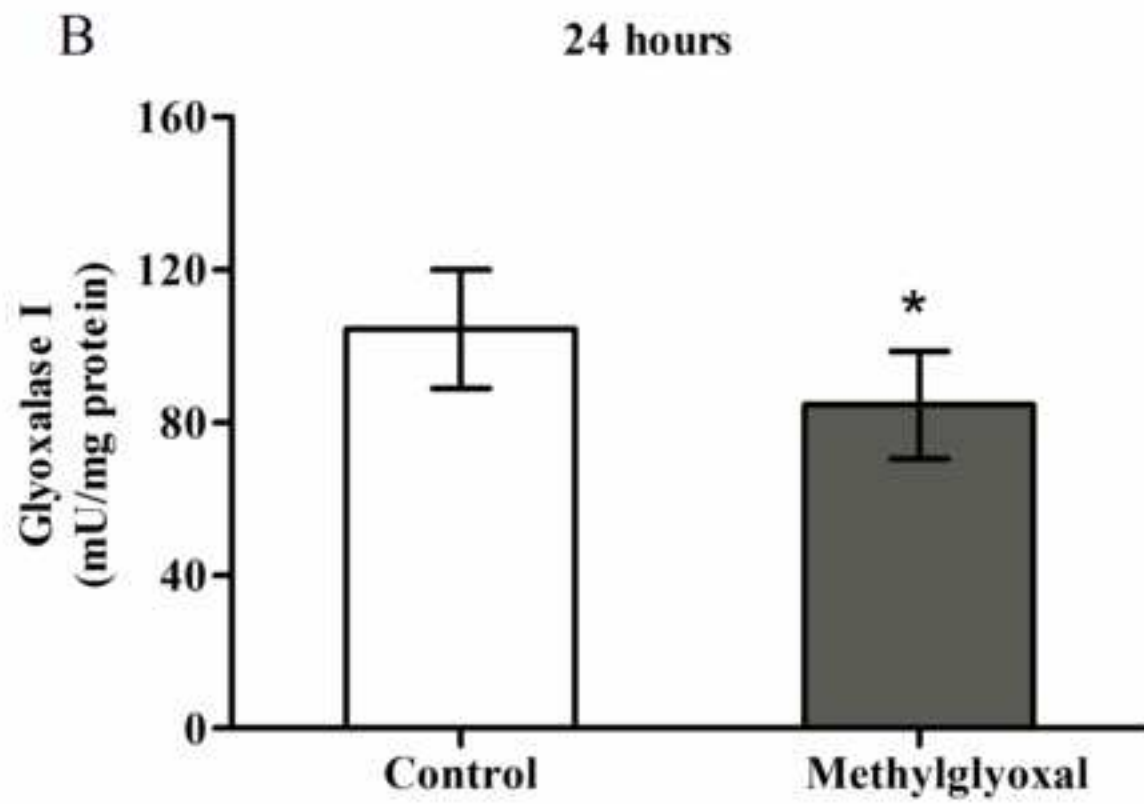
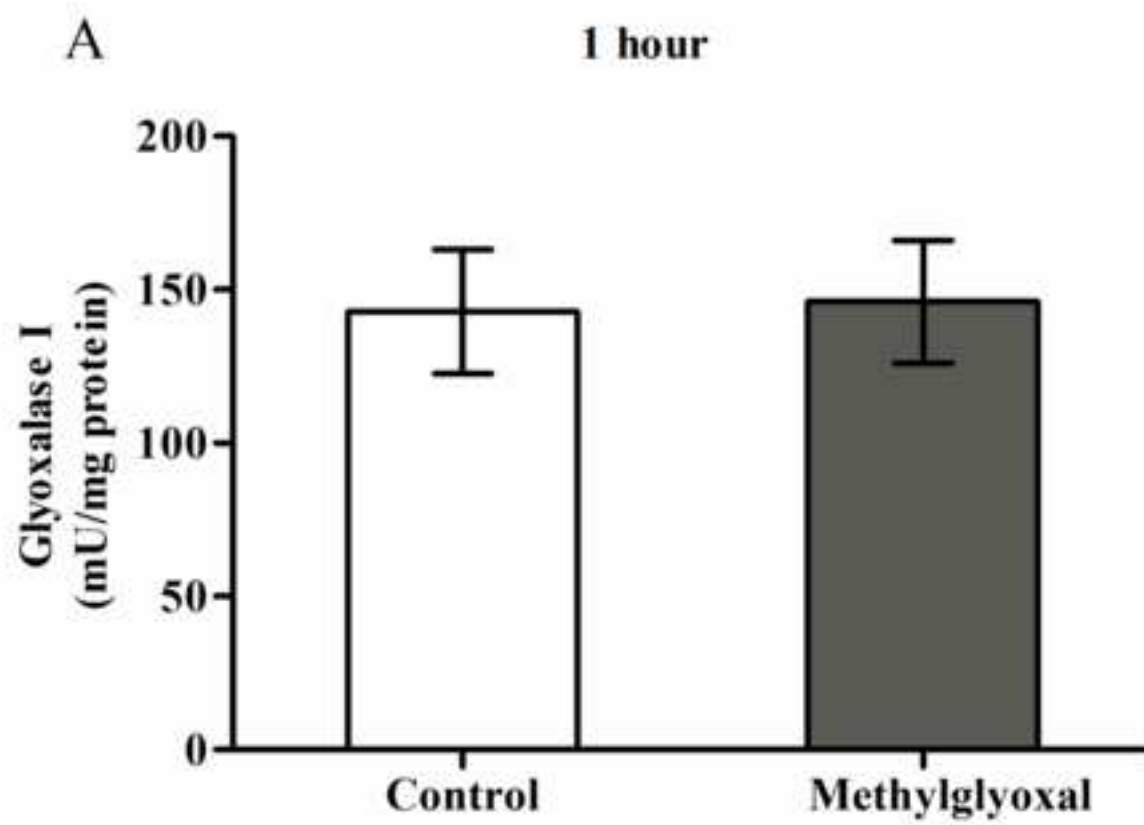


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

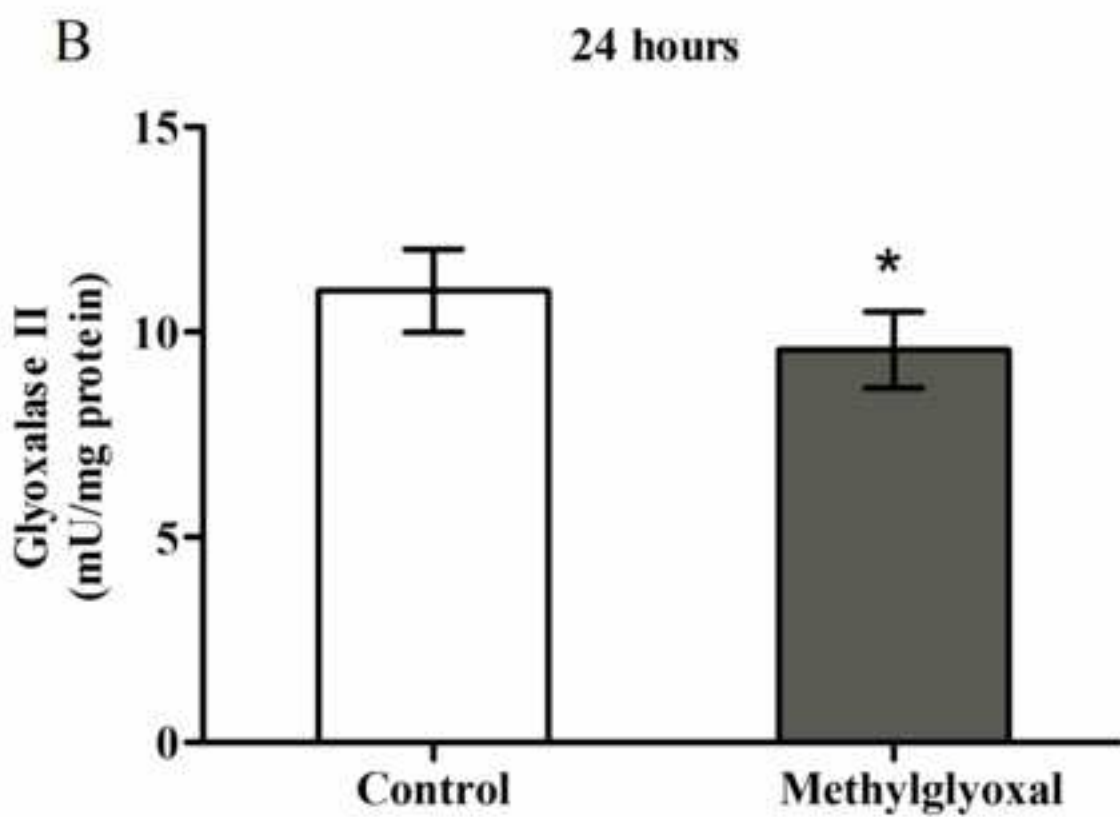
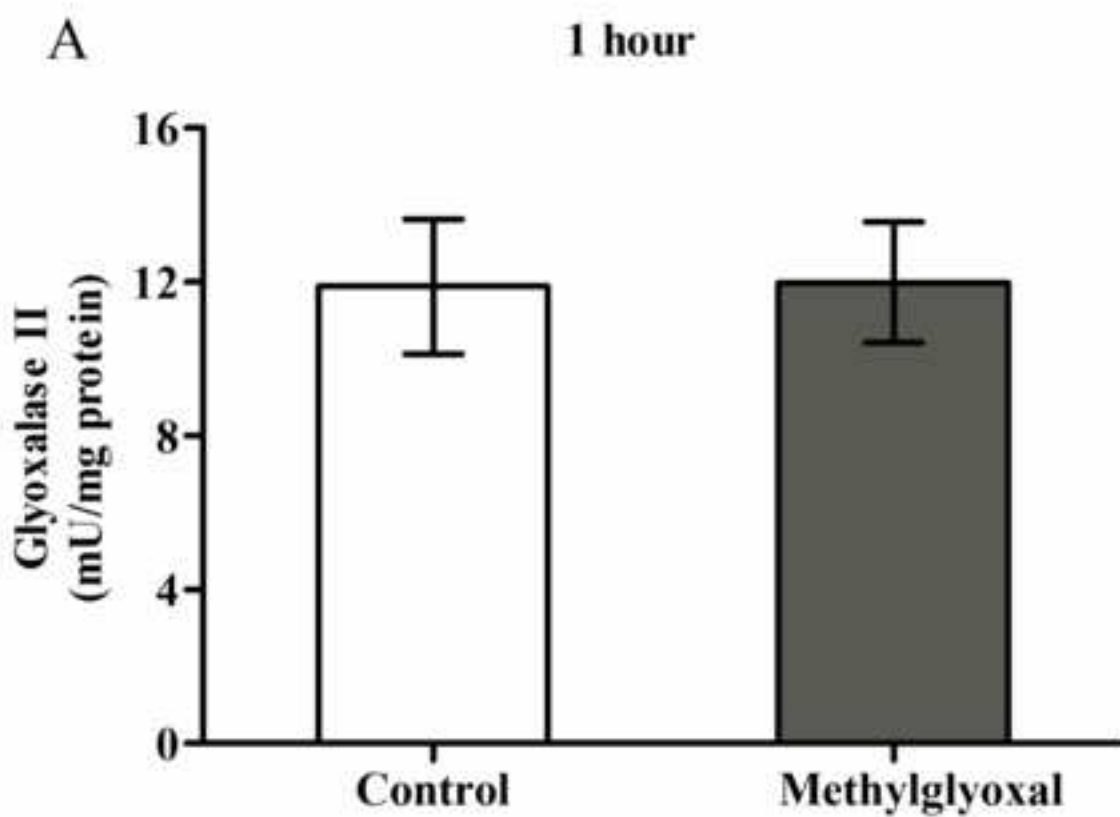


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

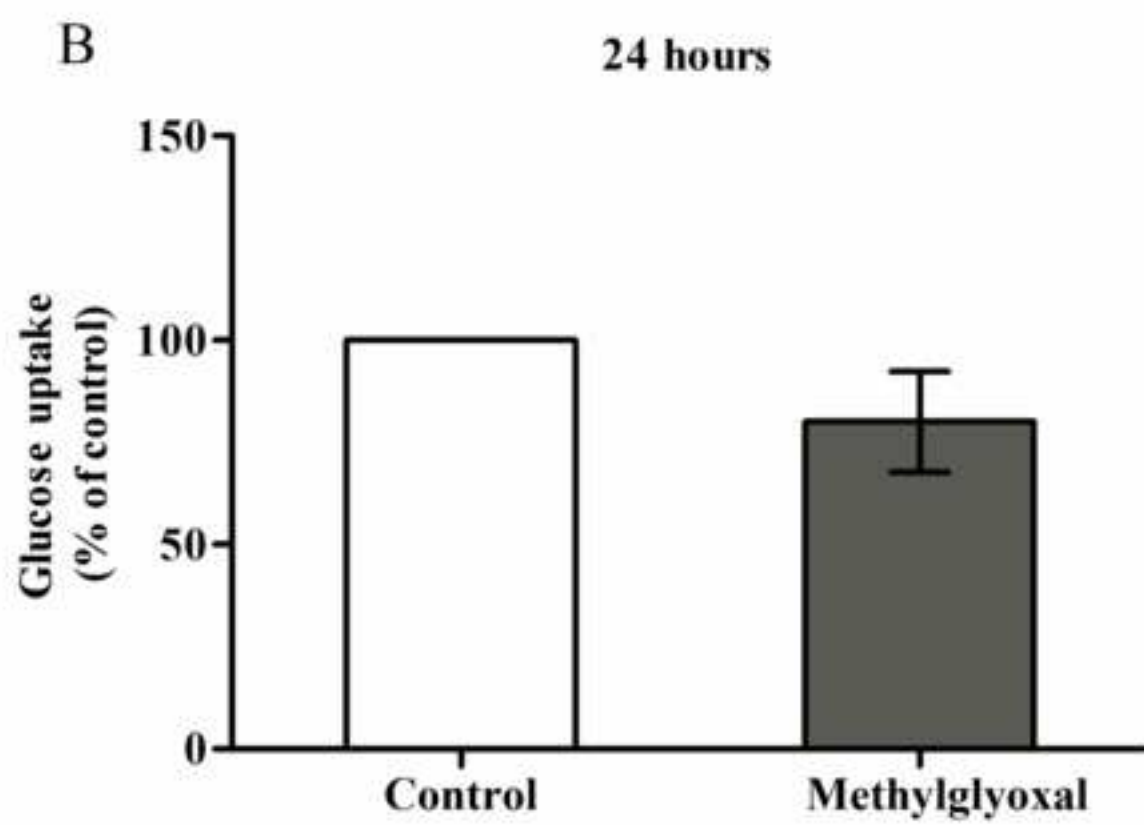
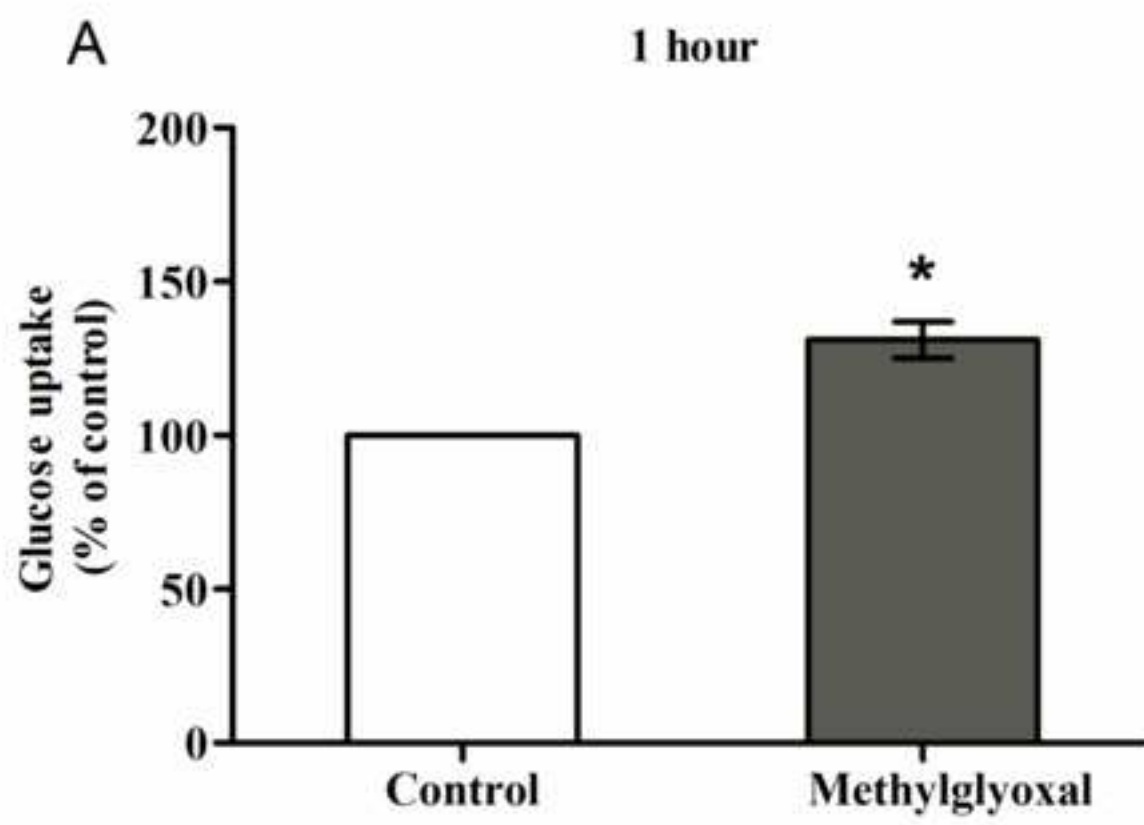


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

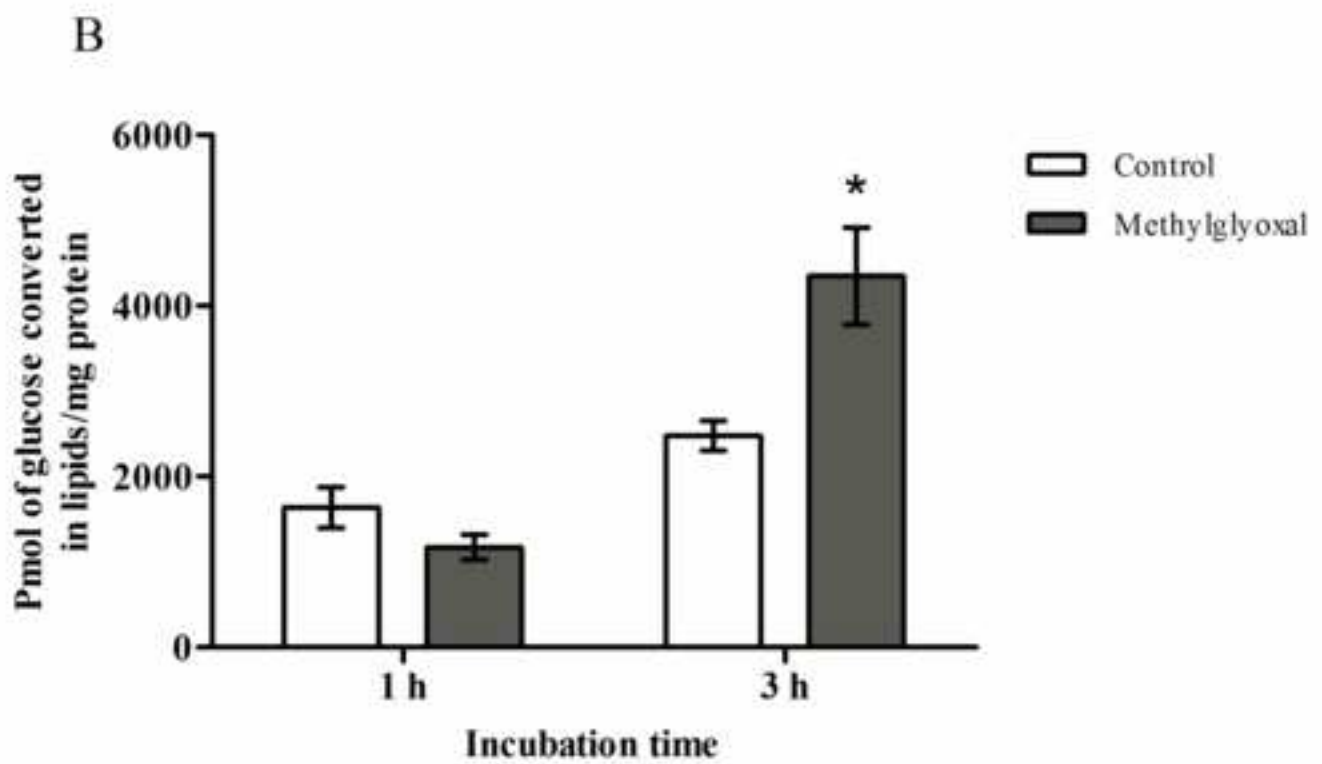
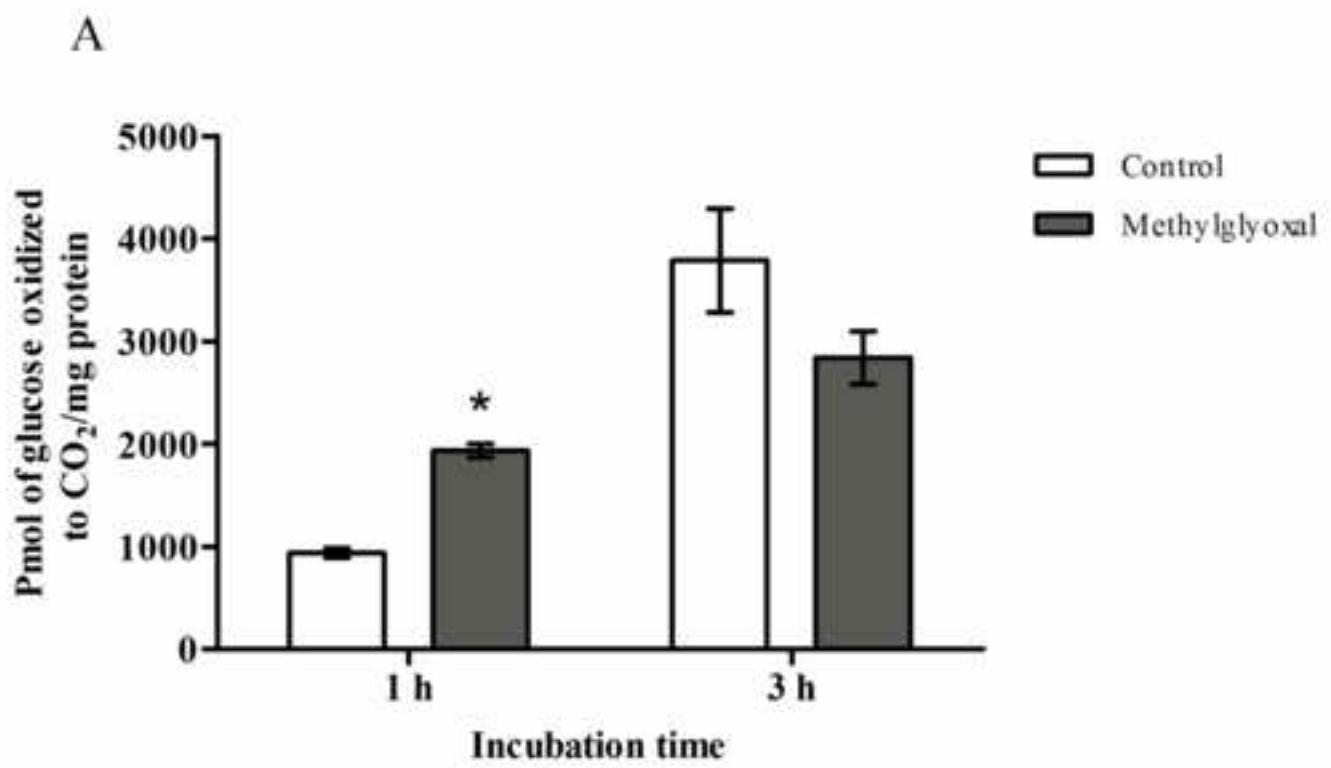


Figure 6

[Click here to download high resolution image](#)

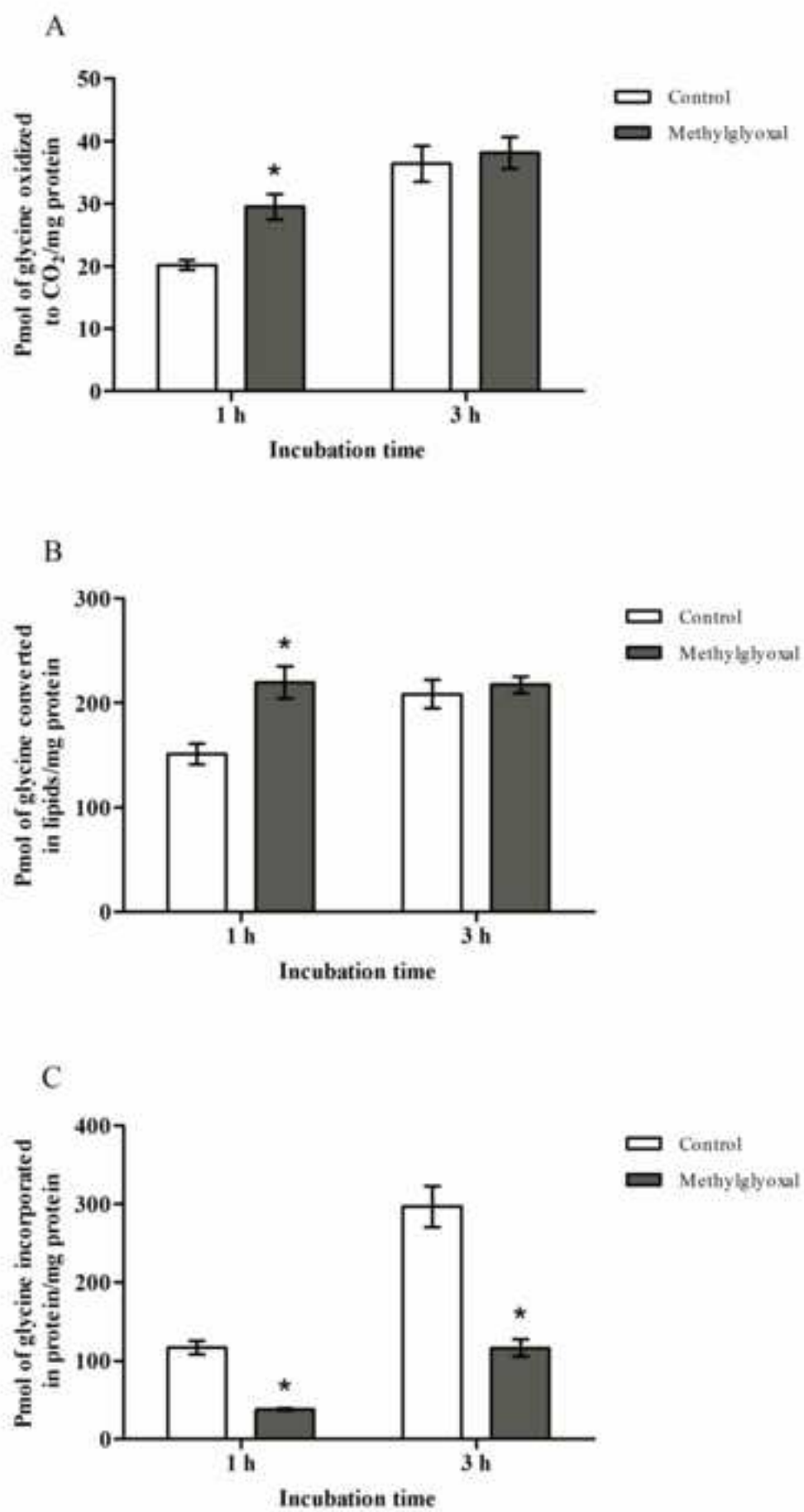
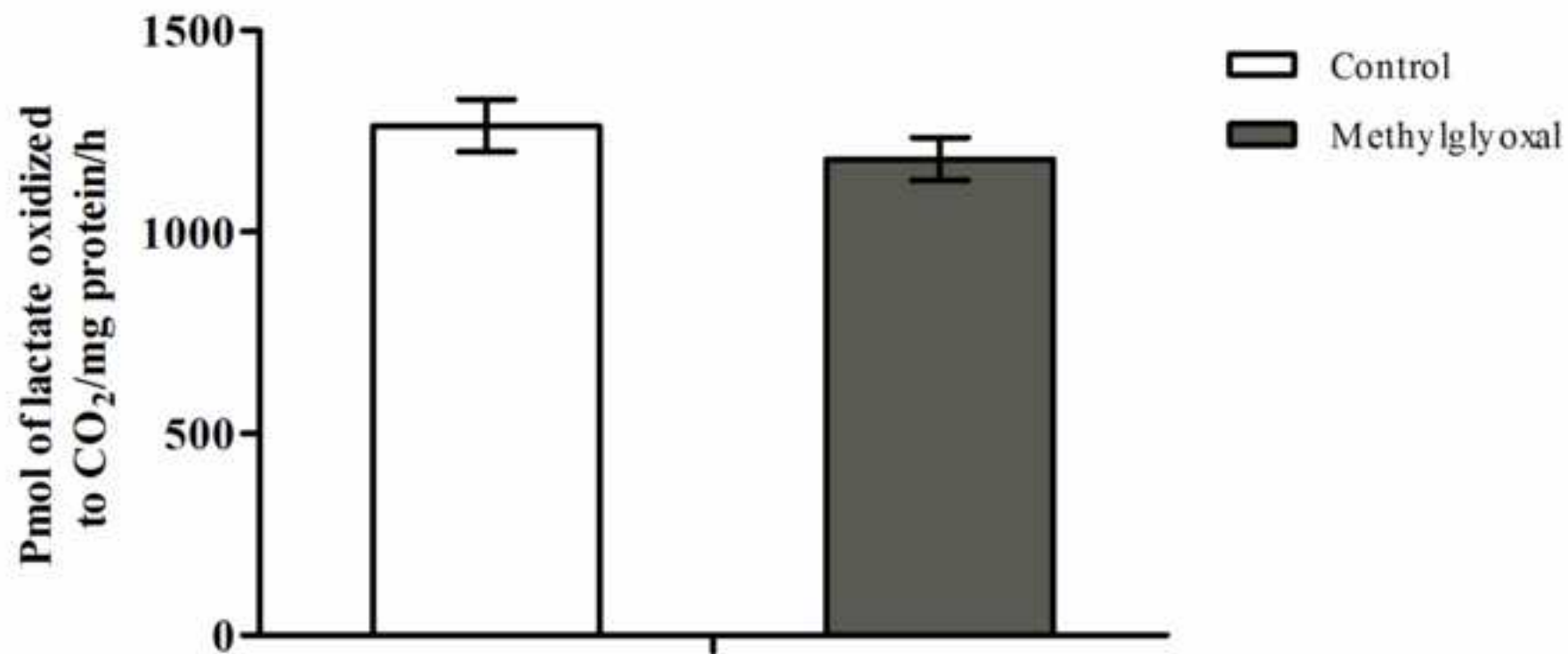


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)



CAPÍTULO 2

**Methylglyoxal alters glutathione content and glutamate uptake in C6
astroglial cells**

Submetido ao periódico Neurochemical Research

Editorial Manager(tm) for Neurochemical Research
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Methylglyoxal alters glutathione content and glutamate uptake in C6 astroglial cells

Article Type: Original

Keywords: methylglyoxal; C6 astroglial cells; oxidative stress; glutathione; glutamate uptake; S100B secretion.

Corresponding Author: Carlos-Alberto Gonçalves, PhD, MD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Fernanda Hansen

Order of Authors: Fernanda Hansen;Daniela Fraga de Souza;André Quincozes-Santos;Marina Concli Leite;Marcos Luiz Santos Perry;Carlos-Alberto Gonçalves, PhD, MD

Suggested Reviewers: Gerald Muench
Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Western Sydney
gerald.muench@jcu.edu.au
Expertise in protein glycation in CNS

Fernanda Amicarelli
Department of Basic and Applied Biology, Faculty of Science, L'Aquila University
fernanda.amicarelli@univaq.it
Expertise in methylglyoxal

Luc Pellerin
Department of Physiology, University of Lausanne
Luc.Pellerin@unil.ch
Expertise in brain metabolism

Cover Letter

Porto Alegre, 14-December-2010

Editor-in-Chief: Abel Lajtha

Neurochemical Research

Dear Editor

Please, find in attachment a manuscript entitled “**Methylglyoxal alters glutathione content and glutamate uptake in C6 astroglial cells**” by Hansen et al. that we wish to submit to your appreciation for publication in the Neurochemical Research.

Sincerely yours,

Carlos Alberto Gonçalves, MD, PhD

Methylglyoxal alters glutathione content and glutamate uptake in C6 astroglial cells

Fernanda Hansen¹, Daniela Fraga de Souza¹, André Quincozes-Santos¹, Marina Concli Leite¹, Marcos Luiz Santos Perry¹ †, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves¹

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

† In memoriam

Running head: Methylglyoxal alters glutathione content and glutamate uptake

Corresponding author: Carlos Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ramiro Barcelos, 2600-Anexo

90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

Telephone: +55 51 33085567

Fax: +55 51 33085539

casg@ufrgs.br

Abstract

Methylglyoxal production has been linked to the formation of intracellular advanced glycation end products and development of neurodegenerative diseases (ND). However, the effects of methylglyoxal on astroglial-specific parameters, such as glutamate uptake and S100B secretion, which are putatively altered in ND, have not been reported. Herein, we evaluated cell viability, the production of reactive oxygen species (ROS), glutathione levels, glutamate uptake and S100B secretion in C6 astroglial cells exposed to methylglyoxal (1 h and 24 h). Our data indicate that methylglyoxal increases ROS formation and decreases intracellular glutathione levels, but does not alter the cell viability or the S100B secretion until 24 h. The extracellular glutathione content and glutamate uptake increases in 1 h, but decreases after 24 h exposure to methylglyoxal. These results indicate that increased levels of methylglyoxal can disrupt the function of C6 astroglial cells and these alterations could contribute to understanding the development of ND.

Keywords: methylglyoxal; C6 astroglial cells; oxidative stress, glutathione; glutamate uptake, S100B secretion.

1. Introduction

Methylglyoxal (MG) is a dicarbonyl compound that is a major precursor of intracellular advanced glycation end-product (AGE) formation [1, 2]. It is extremely reactive [3] and physiologically produced by both enzymatic and nonenzymatic reactions involved in glycine, threonine and glucose catabolism [4] and in acetone and aminoacetone metabolism [5]. Methylglyoxal, albeit a natural biological product, is cytotoxic [5], and the formation of AGEs mediates its toxicity [6].

AGEs have been linked to the development of several degenerative conditions, including diabetic complications and Alzheimer's disease (AD). In AD, AGEs accumulate age- and stage-dependently in neurons and astroglia, and they are also increasingly found in neuritic amyloid plaques [7]. In addition, high levels of methylglyoxal have been found in the cerebrospinal fluid of patients affected by AD and in the plasma of diabetic individuals [8, 9].

Plasma methylglyoxal levels are about 0.5 $\mu\text{mol/L}$ in healthy individuals and can increase twofold in diabetes [10]; however, the level in poorly controlled human diabetic patients is about 400 $\mu\text{mol/L}$ [11]. Although the exact intracellular concentration of methylglyoxal in neurons and astroglial cells is not yet known, concentrations of up to 300 μM have been measured in cultured CHO cells, where most of it bound to cysteine residues and glutathione [12].

Methylglyoxal may contribute to the development of neurodegenerative diseases (ND) promoting oxidative stress [5] and leading to an imbalance between accumulation and detoxification of reactive carbonyl compounds [13]. Astrocytes are the most abundant glial cells and are involved in antioxidant defense and glutamate clearance [14, 15, 16]. Glyoxal-impaired glutamate transport in cultured rat astrocytes and the resultant effects can lead glutamate toxicity [17].

There is a lack of information about the effect of methylglyoxal on glutamate uptake and S100B secretion in astroglial cells. Moreover, the contribution of methylglyoxal in ND is not yet well understood. In this study, we examined the effect of methylglyoxal (400 μ M) on cell viability, ROS production, intracellular and extracellular glutathione (GSH) levels, glutamate uptake and S100B secretion in C6 glial cells after both 1 h and 24 h of treatment.

2. Experimental Procedure

2.1 Materials

Methylglyoxal, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, neutral red, standard GSH, *o*-phthaldialdehyde, DCF-DA, anti-S100B (SH-B1) and cell culture materials were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except for Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) which was purchased from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Cultilab (Campinas, SP, Brazil) and L-[2,3-³H] glutamate was purchased from Amersham International (UK). Polyclonal anti-S100B and anti-rabbit peroxidase linked antibodies were purchased from Dako and GE, respectively. Anti-AGEs (6D12) was purchased from Cosmo Bio Co., LTD. All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

2.2 C6 astroglial cell culture

The C6 glioma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Late passage cells harvested after at least 100 passages were seeded in 24-well plates at densities of 10^4 cells/well and cultured in DMEM (pH 7.4) supplemented with 5% fetal bovine serum, 2.5 mg/mL Fungizone and 100 U/L gentamicin in 5% CO₂/95% air at 37 °C. After cells reached confluence, the culture

medium was replaced by DMEM without serum in the absence or presence of methylglyoxal (400 μ M) [18].

2.3 MTT reduction assay

Cells were treated with 50 μ g/mL methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) for 30 min in 5% CO₂/95% air at 37°C. Then, the media was removed and MTT crystals were dissolved in DMSO. Absorbance values were measured at 560 and 650 nm. The reduction of MTT was calculated by the following formula: [(abs 560 nm) – (abs 650 nm)]. Results were expressed as percentage of the control [19].

2.4 Neutral Red (NR) incorporation assay

Cells were treated with 50 μ g/mL neutral red (NR) for 30 min in 5% CO₂/95% air at 37°C. Afterward, the cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min each time. Then, the NR dye taken up by viable cells was extracted with 500 μ L of acetic acid/ethanol/water (1/50/49, v/v). Absorbance values were measured at 560 nm. Results were expressed as a percentage of the control [19].

2.5 Evaluation of intracellular ROS production

Intracellular ROS production was detected via the nonfluorescent cell permeating compound, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). DCF-DA is hydrolyzed by intracellular esterases and then oxidized by ROS to a fluorescent compound, 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH). C6 cells were treated with DCF-DA (10 μ M) for 30 min at 37°C. Following DCF-DA exposure, the cells were rinsed and then scraped into PBS with 0.2% Triton X-100. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max Gemini XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at

520 nm [20]. Values were obtained as fluorescence units per milligram of protein and expressed as percentage of control.

2.6 Glutamate uptake assay

Glutamate uptake was performed as previously described [21] with some modifications. The C6 glioma cells were briefly incubated at 37°C in a Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄·7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was initiated by the addition of 0.1 mM L-glutamate and 0.33 µCi/mL L-[2,3-³H] glutamate. Incubation was stopped after 10 min by removing the medium and rinsing the cells twice with ice-cold HBSS. The cells were then lysed in a 0.5 M NaOH solution. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Sodium-independent uptake was determined using *N*-methyl-D-glucosamine instead of NaCl. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake from the total uptake to obtain the specific uptake. Values are expressed as nmol/mg protein/min.

2.7 Glutathione (GSH) content assay

Intracellular glutathione levels (nmol/mg protein) and extracellular glutathione levels (nmol/mL) were measured as previously described [22]. Cell homogenates were diluted in ten volumes of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA, or supernatant was collected to measure the extracellular glutathione content and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with *o*-phthaldialdehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm,

respectively. A calibration curve was ascertained using standard GSH solutions (0–500 μM).

2.8 S100B measurement

S100B was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay as previously described [23]. Briefly, 50 μL of sample and 50 μL of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1) antibody. Polyclonal anti-S100 antibody was incubated for 30 min, and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for an additional 30 min. A colorimetric reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm.

2.9 AGE measurement

AGEs were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay as previously described [24], with same modifications. The wells of a microtiter plate were coated overnight with 0.1 μg protein in 0.1 mL of 50 mM carbonate bicarbonate buffer (pH 9.6). The wells were washed three times with washing buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) and then incubated for 3 h with 2% albumin from chicken egg white to block nonspecific binding. Subsequently, wells were washed again with washing buffer and incubated with 100 μL anti-AGE (6D12) for 1 h. After three washings, wells were incubated with 100 μL peroxidase-conjugated secondary antibody for 60 min. The reactivity of peroxidase was determined by incubation with *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 50 μL sulfuric acid (3 M). Absorbance measurements were taken at 492 nm.

2.10 Protein determination

Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard [25].

2.11 Statistical Analysis

Parametric data or non-parametric data are reported as the mean \pm standard error and were analyzed by Student's *t*-test. Data was considered significant when $p < 0.05$. All analyses were using the SPSS software package.

3. Results

Methylglyoxal increases ROS production, but does not affect cell viability of C6 glioma cells

The effect of methylglyoxal on ROS production in C6 astroglial cells was evaluated by a DCFH oxidation assay (Fig. 1A). ROS increased by approximately 15% and 25% in 1 and 24 h, respectively after exposure to methylglyoxal (at 400 μ M). However, no impairment of cell viability was observed at these times when C6 cells were evaluated by an MTT reduction assay (Fig. 1B) and neutral red incorporation (Fig. 1C).

Methylglyoxal effected intracellular and extracellular content of glutathione

To evaluate the influence of methylglyoxal in C6 antioxidant defense, we measured the intracellular glutathione content in 1 and 24 h incubation with this compound in a serum-free medium of culture. In presence of methylglyoxal, the internal cell glutathione content decreased by approximately 27% (Fig. 2A) and 34% (Fig. 2B) in 1 and 24 h, respectively. We noticed that the amount of basal glutathione increased from 1 to 24 h, which was possibly induced by serum deprivation. Interestingly, we found an increase (approximately 52%) the extracellular content of glutathione 1 h after

methylglyoxal exposure (Fig. 3A), but conversely a decrease after 24 h (approximately 25%) (Fig. 3B). Moreover, the basal extracellular content of glutathione also increased between 1 and 24 h.

Methylglyoxal effects glutamate uptake in C6 glioma cells, but does effect not the S100B secretion

To evaluate astroglial-specific parameters effected by methylglyoxal we measured glutamate uptake (Fig. 4) and S100B secretion (Fig. 5). Glutamate uptake activity was increased (approximately 87%) after a 1 h exposure to methylglyoxal (Fig. 4A), but a significant decrease (approximately 26%) was observed after a 24 h exposure (Fig. 4B). Conversely, no changes were observed in S100B secretion due to the presence of methylglyoxal for 1 or 24 h (Fig. 5A and 5B, respectively), but basal extracellular S100B content increased from 1 to 24 h.

4. Discussion

Our results show that methylglyoxal (400 μM) increases ROS production in C6 astroglial cells after both 1 and 24 h (Fig. 1A). Previous studies demonstrated an increase in ROS production after exposure to methylglyoxal at differing concentrations (from 70 μM to 600 μM) and incubation times. These studies investigated primary neuronal cultures [26], human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) [3, 5, 13] and human glioblastoma cells (ADF) [5]. Furthermore, methylglyoxal does not change the cell viability as measured by an MTT reduction assay and the NR incorporation at 1 and 24 h (Fig. 1B and 1C, respectively).

Glutathione is an important antioxidant for the cellular detoxification of ROS in brain cells [27]. The depletion of GSH in glial cells is related to neurotoxicity and

neuroinflammation [28]. Moreover, studies demonstrated that GSH levels decreased after methylglyoxal exposure [5, 6]. This effect occurred concomitantly with the reduction of glutathione synthetase activity in a time-dependent manner in human neuroblastoma and glioblastoma cells [5]. In accordance with these reported data, the intracellular levels of glutathione decreased after methylglyoxal exposure from 1 to 24 h (Fig. 2).

The extracellular GSH content increases in 1 h (Fig. 3A) and this effect may be related to a decrease in intracellular GSH levels. Glutathione can be released to the extracellular medium where it then serves as a substrate for glutathione synthesis in neurons [27, 28]. Not surprisingly, under oxidative stress intracellular glutathione is actively secreted [27, 29] and, moreover, GSH added to the extracellular medium attenuated the inflammatory response in several cell types [28]. In this context, extracellular GSH may modulate glutamate receptors [30] and could also modulate glutamate transporters. These effects could explain the increase in glutamate uptake in C6 astroglial cells after methylglyoxal exposure for 1 h (Fig. 4A). Nevertheless, high levels of extracellular glutamate induces a release of glutathione from cultured rat astrocytes, but this effect is independent of the activation of NMDA or non-NMDA glutamate receptors [31].

Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis due to the activation of a Na^+/K^+ ATPase by an increase in the intracellular concentration of Na^+ cotransported with glutamate [32]. In this context, the increase in glutamate uptake in C6 astroglial cells can stimulate the Na^+/K^+ ATPase activity, which may lead to an increase in aerobic glycolysis. These effects are consistent with another study from our laboratory, where methylglyoxal enhanced glucose oxidation to CO_2 (unpublished data).

Therefore, the short-term effect of methylglyoxal on glutamate uptake could be dependent of glutathione release.

In addition, methylglyoxal decreases the extracellular GSH content and the glutamate uptake in 24 h (Fig. 3B and 4B, respectively). Previous data demonstrated that methylglyoxal leads to protein carbonylation of glycolytic or mitochondrial enzymes and decreases ATP content and mitochondrial membrane potential in neuroblastoma cells for 24 h [3, 13]. These effects may help explain the reduction in intracellular GSH levels because ATP is essential for GSH synthesis. Moreover, the decrease in ATP content can also reduce the Na^+/K^+ ATPase activity and then attenuate the glutamate uptake in C6 astroglial cells. Glyoxal, a reactive aldehyde compound, inactivates the glutamate transporter-1 (GLT-1) in cultured rat astrocytes and decreases glutamate uptake due to GLT-1 CML adduct formation in the glyoxal-exposed cells [17]. We also observed a significant increase of AGE formation in 24 h of methylglyoxal exposure in C6 glial cells (data not shown).

Methylglyoxal did not alter S100B secretion between 1 and 24 h (Fig. 5A, B). However the redox-active compound resveratrol increases the S100B secretion in C6 astroglial cells [33] and hydrogen peroxide decreases the S100B secretion in rat hippocampal slices [34]. Therefore, methylglyoxal, which can be considered an oxidizing agent, could lead to changes in S100B secretion. Because the mechanism of S100B secretion is still unknown, it is yet to be determined whether methylglyoxal can interact directly with S100B or can modulate its secretion. Future studies need to be performed to fully understand the effects of methylglyoxal on S100B secretion.

In summary, our data indicate that methylglyoxal induces an increase in oxidative stress and a reduction in intracellular glutathione content in short (1 h) and long term (24 h) exposure. Extracellular glutathione content and glutamate uptake

increase one hour after methylglyoxal exposure and these events may be associated with stress-induced cellular repair. Methylglyoxal, in 24 hours, induced a decrease in extracellular glutathione content and glutamate uptake, which may indicate a time-dependent mechanism for damage in glial cells. These results provide evidence that increased levels of methylglyoxal can disrupt the function of astroglial cells through changes in ROS formation, GSH levels and glutamate uptake. Together, with AGE formation, these alterations induced by methylglyoxal could contribute to an understanding of the development of ND. Moreover, identification of targets of methylglyoxal toxicity can help in the design of therapeutic strategies for neurodegenerative diseases.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection. We would like to thank Ms. Gisele Souza for technical support with cell culture.

References

1. Thornalley PJ (2005) Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci* 1043:111-117.
2. Nemet I, Varga-Defterdarovic L, Turk Z (2006) Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol Nutr Food Res* 50:1105-1117.
3. de Arriba SG, Stuchbury G, Yarin J et al. (2007) Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells--protection by carbonyl scavengers. *Neurobiol Aging* 28:1044-1050.
4. Vander Jagt DL, Hunsaker LA (2003) Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-1, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions* 143:341-351.
5. Amicarelli F, Colafarina S, Cattani F et al. (2003) Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radic Biol Med* 35:856-871.
6. Di Loreto S, Zimmitti V, Sebastiani P et al. (2008) Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 40:245-257.
7. Luth HJ, Ogunlade V, Kuhla B et al. (2005) Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cerebral Cortex* 15:211-220.
8. Kuhla B, Luth HJ, Haferburg D et al. (2005) Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Maillard Reaction: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease* 1043:211-216.

9. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J et al. (1994) Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 87:21-29.
10. Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A et al. (2003) Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med* 41:1166-1173.
11. Lapolla A, Reitano R, Seraglia R et al. (2005) Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol Nutr Food Res* 49:685-690.
12. Chaplen FW, Fahl WE, Cameron DC (1998) Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5533-5538.
13. de Arriba SG, Krugel U, Regenthal R et al. (2006) Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 40:779-790.
14. Wilson JX (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1149-1163.
15. Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342-367.
16. Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14:346-352.
17. Kawaguchi M, Shibata N, Horiuchi S et al. (2005) Glyoxal inactivates glutamate transporter-1 in cultured rat astrocytes. *Neuropathology* 25:27-36.
18. de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A et al. (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* 206:52-57.

19. Leite MC, Galland F, de Souza DF et al. (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res* 87:2439-2446.
20. Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Tonial RP et al. (2010) Effects of atypical (risperidone) and typical (haloperidol) antipsychotic agents on astroglial functions. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 260:475-481.
21. Gottfried C, Tramontina F, Goncalves D et al. (2002) Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev* 123:1333-1340.
22. Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347-352.
23. Leite MC, Galland F, Brolese G et al. (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169:93-99.
24. Ikeda K, Higashi T, Sano H et al. (1996) N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry* 35:8075-8083.
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
26. Di Loreto S, Caracciolo V, Colafarina S et al. (2004) Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1beta and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells. *Brain Res* 1006:157-167.

27. Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19:562-569.
28. Lee M, Cho T, Jantaratnotai N et al. (2010) Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB Journal* 24:2533-2545.
29. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J et al. (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4904-4911.
30. Janaky R, Ogita K, Pasqualotto BA et al. (1999) Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem* 73:889-902.
31. Frade J, Pope S, Schmidt M et al. (2008) Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes--a possible neuroprotective mechanism? *J Neurochem* 105:1144-1152.
32. Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-10629.
33. Quincozes-Santos A, Nardin P, de Souza DF et al. (2009) The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res* 16:30-41.
34. de Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP et al. (2008) Resveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch Biochem Biophys* 480:27-32.

Legends

Fig. 1 Effect of methylglyoxal on ROS production and cell viability. C6 glioma cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h and 24 h in DMEM without serum and DCFH oxidation (A), MTT reduction (B) and neutral red incorporation (C) assays were performed. Data are expressed as the mean \pm standard error of four independent experiments performed in quadruplicate. *Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Fig. 2 Methylglyoxal alters intracellular glutathione content. C6 glioma cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h (A) and 24 h (B) in DMEM without serum. Data are expressed as the mean \pm standard error of five independent experiments performed in triplicate. *Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Fig. 3 Methylglyoxal affects extracellular glutathione content. C6 glioma cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h (A) in 24 h (B) in DMEM without serum. Data are expressed as the mean \pm standard error of five independent experiments performed in triplicate. *Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Fig. 4 Influence of methylglyoxal on glutamate uptake. C6 glioma cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h (A) in 24 h (B) in DMEM without serum. Data are expressed as the mean \pm standard error of three independent experiments performed in quadruplicate. *Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Fig. 5 S100B secretion is not modified by methylglyoxal exposure. C6 glioma cells were treated with methylglyoxal (400 μ M) for 1 h (A) in 24 h (B) in DMEM without serum. Data are expressed as the mean \pm standard error of five independent experiments performed in quadruplicate. *Significant statistical difference from control (Student t-test, assuming $p < 0.05$).

Figure 1

[Click here to download high resolution image](#)

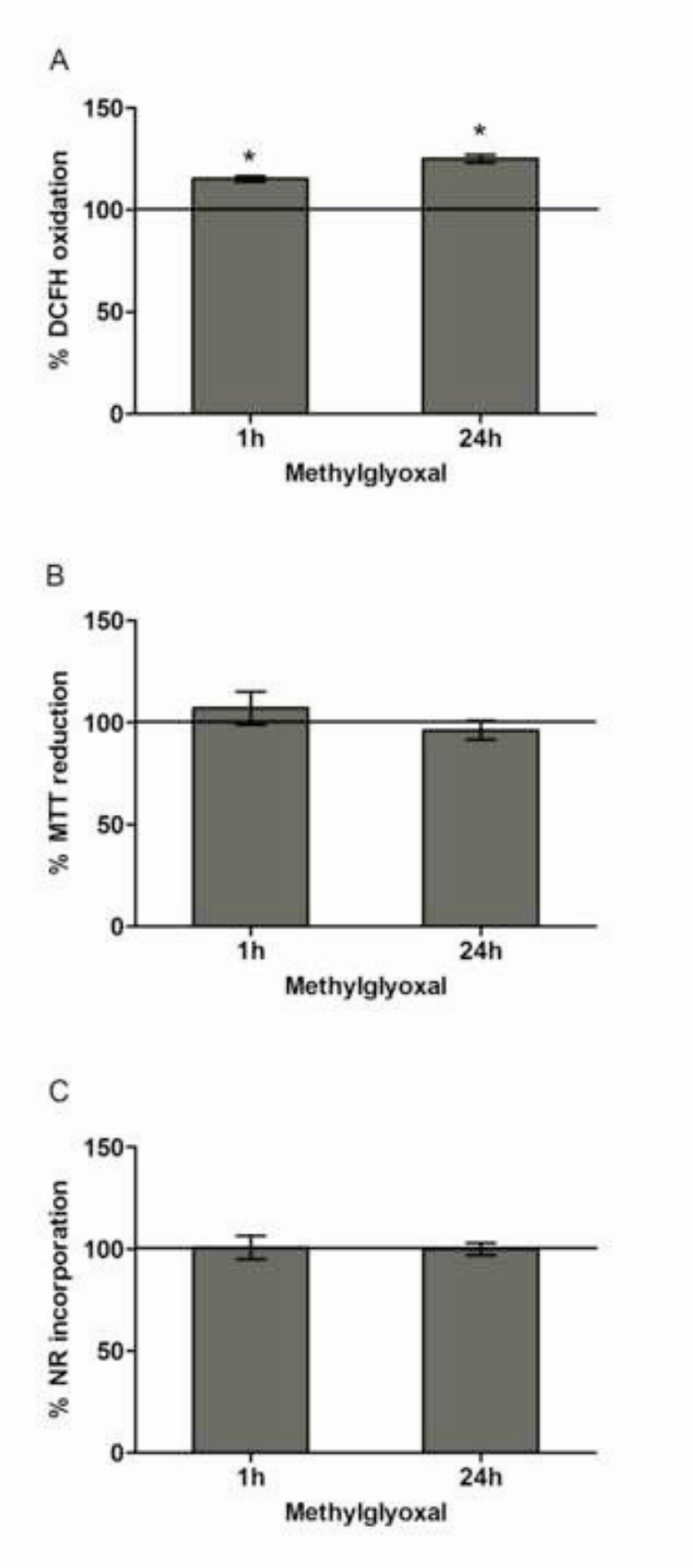


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

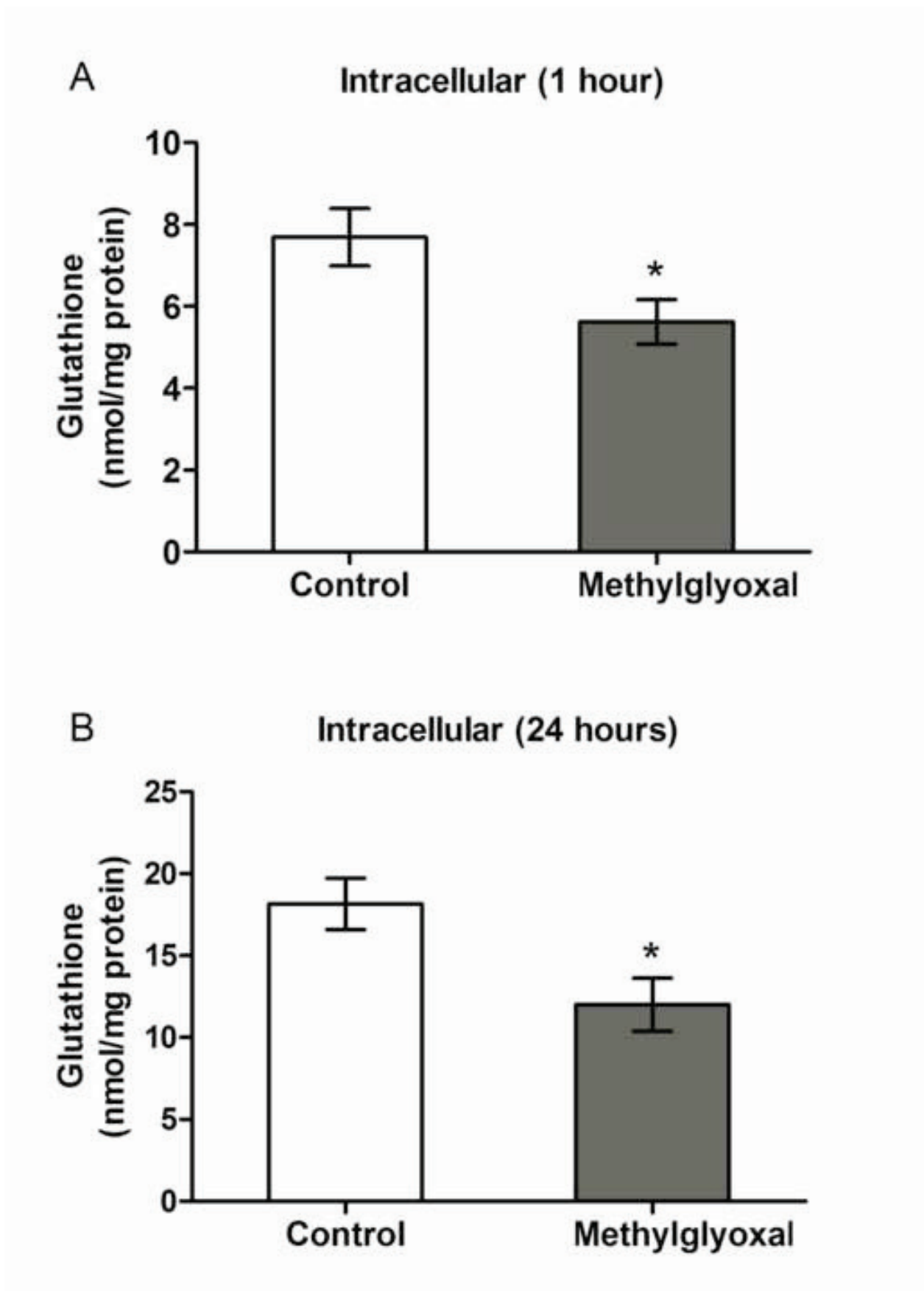


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

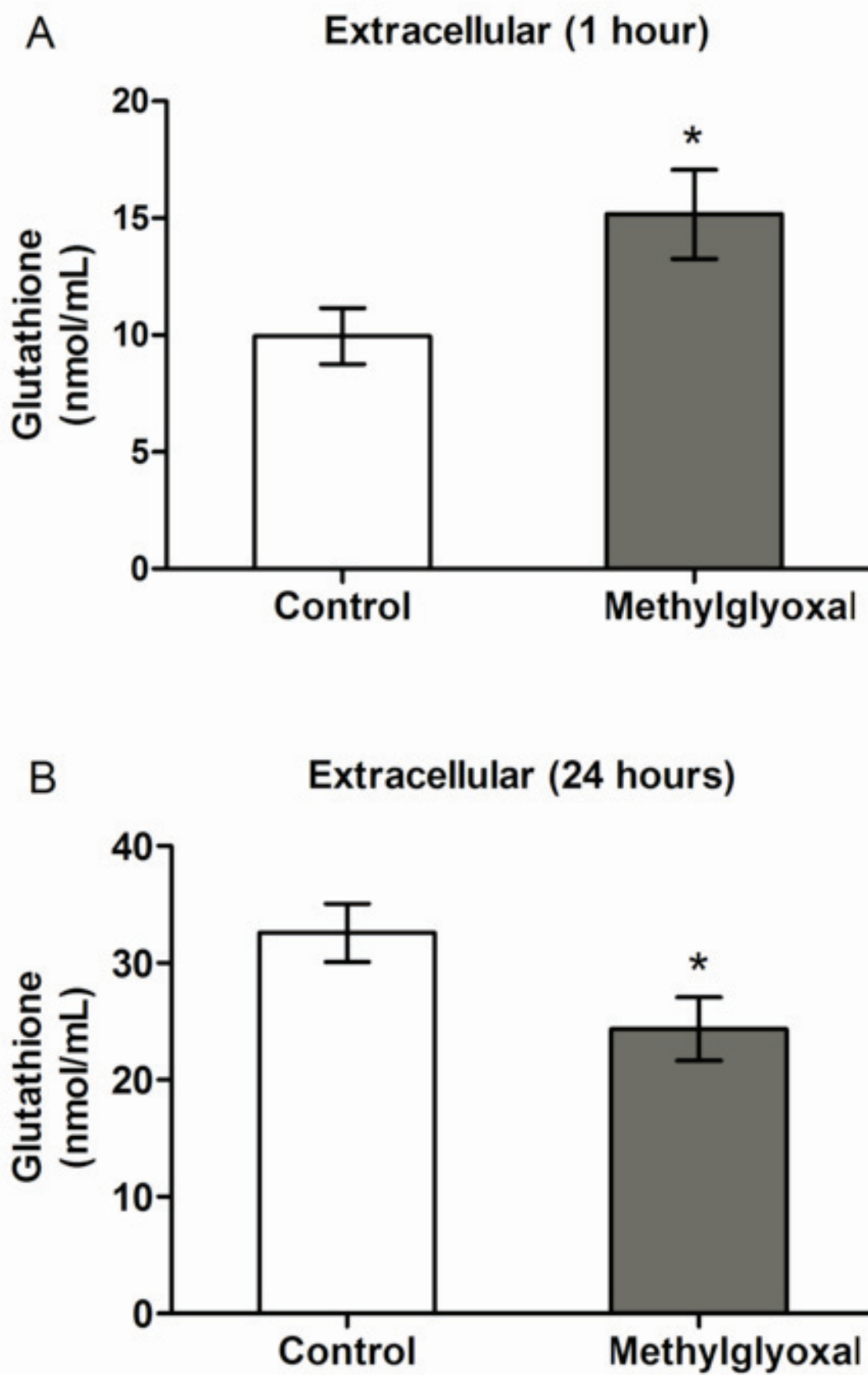


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

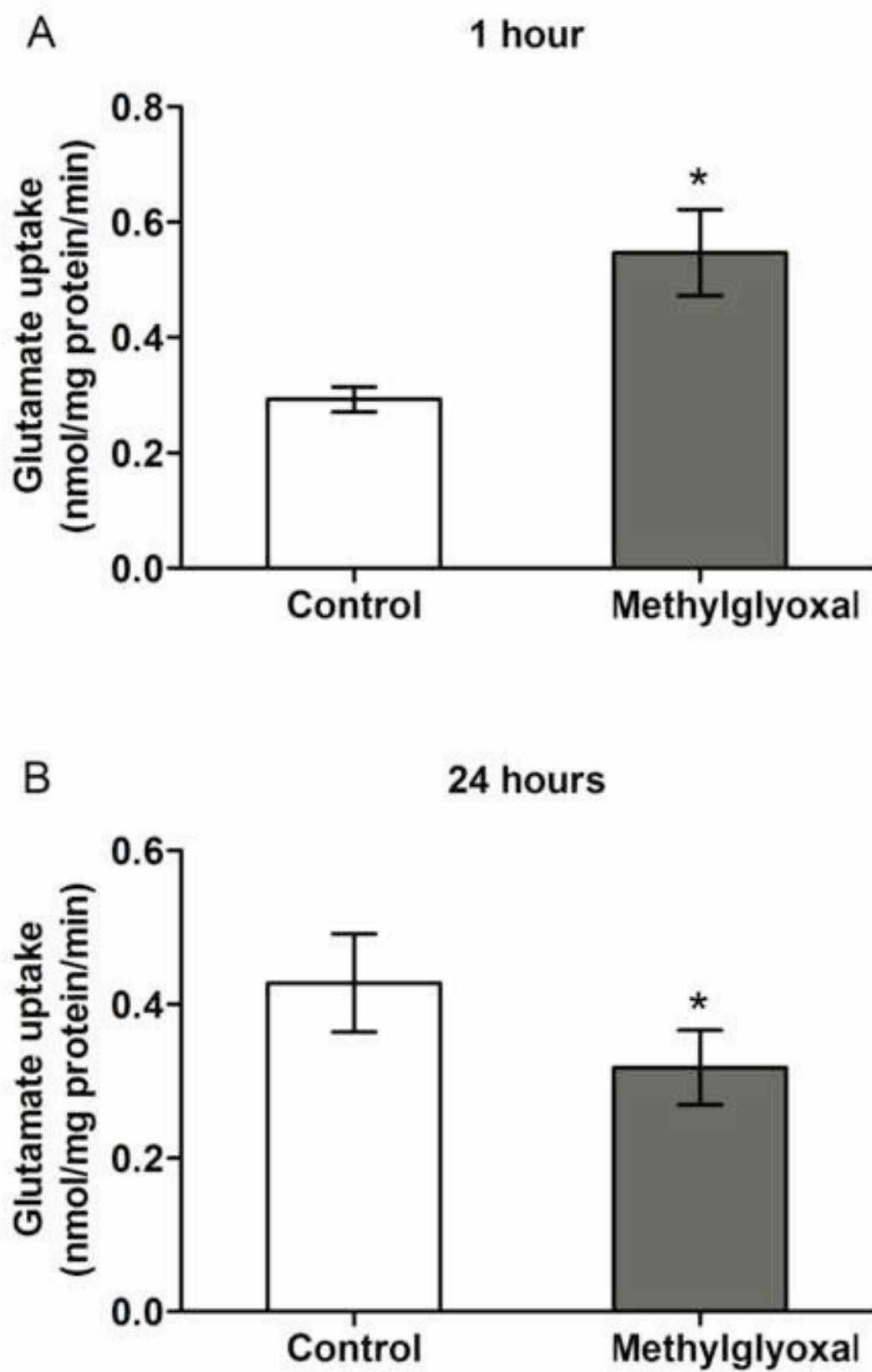
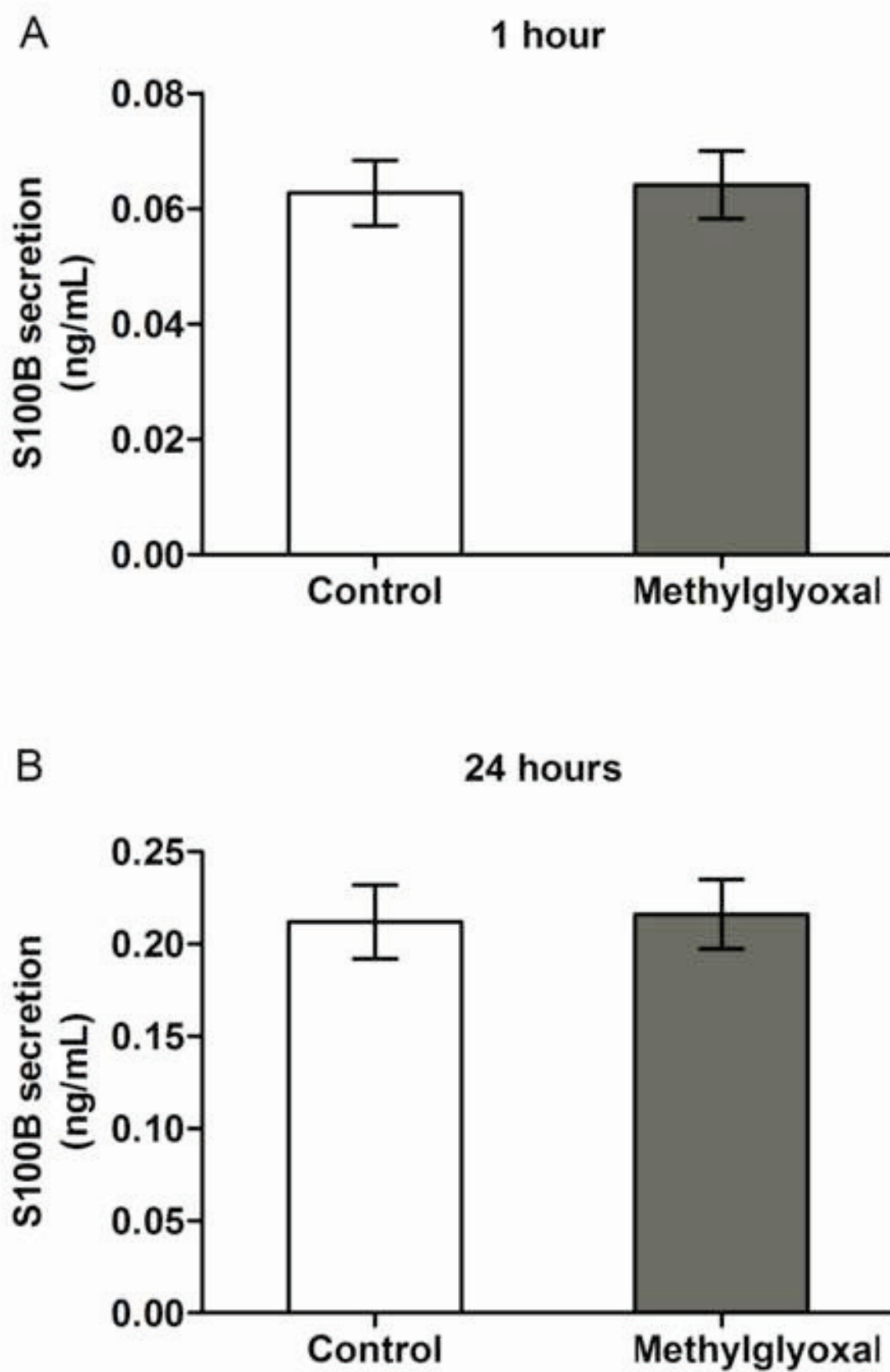


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)



DISCUSSÃO

As concentrações fisiológicas e patológicas de metilglioxal *in vivo* ainda não estão bem estabelecidas, o que se sabe somente é que o aumento dos níveis de metilglioxal está relacionado com sua citotoxicidade e com o surgimento ou agravamento de doenças neurodegenerativas. Embora, a concentração de metilglioxal em astrócitos e neurônios não foi determinada, já foi proposto que no cérebro de pacientes com DA os níveis de metilglioxal são 5 a 7 vezes mais elevados do que no plasma (Kuhla et al. 2005) e que em pacientes com DM não controlado os níveis plasmáticos são próximos de 400 μM (Lapolla et al. 2005a).

Diferentes concentrações de metilglioxal são utilizadas nos estudos *in vitro*, que vão desde a ordem de micromolar até milimolar (Di Loreto et al. 2004, Amicarelli et al. 2003, de Arriba et al. 2006). As diferentes concentrações de metilglioxal utilizadas devem-se a diferente suscetibilidade das células a toxicidade do metilglioxal (Amicarelli et al. 2003), que se atribui, pelo menos em parte, a capacidade antioxidante e a existência de diferentes vias de detoxificação deste aldeído. Nossos resultados mostram que o metilglioxal (100 e 400 μM) não alterou a incorporação de iodeto de propídio até 24 horas nas células de glioma C6 (Figura 1, Capítulo 1). Além disso, 400 μM de metilglioxal também não modificou a viabilidade celular medida através do ensaio de redução de MTT e incorporação de vermelho neutro até 24 horas (Figura 1, Capítulo 2). Portanto, a concentração de 400 μM foi a escolhida para estudo dos objetivos propostos nesta dissertação.

Estudos prévios mostraram um aumento na produção de ERO após a exposição ao metilglioxal em diferentes concentrações (de 70 μM a 600 μM) e diferentes tempos de incubação. Nestes estudos foram investigados os efeitos do metilglioxal em cultura

primária de neurônios (Di Loreto et al. 2004), células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) (de Arriba et al. 2007, Amicarelli et al. 2003, de Arriba et al. 2006) e células de glioblastoma humano (ADF) (Amicarelli et al. 2003). De acordo com esses achados, nossos resultados também mostram que o metilglioxal aumenta a produção de espécies reativas em células astrogiais C6 em 1 e 24 horas (Figura 1, Capítulo 2). Concomitantemente, os níveis intracelulares de GSH reduziram após a exposição ao metilglioxal em 1 e 24 horas (Figura 2, Capítulo 2).

A GSH é um antioxidante importante para o combate das espécies reativas, especialmente nas células do sistema nervoso central (Dringen et al. 1999). A depleção de GSH em células gliais está relacionada com neurotoxicidade e neuroinflamação (Lee et al. 2010), sendo que sua depleção foi observada tanto em pacientes com DA quanto em pacientes com DM (Calabrese et al. 2006). Além disso, estudos demonstraram que os níveis de GSH diminuíram após exposição ao metilglioxal (Di Loreto et al. 2008, Amicarelli et al. 2003). Este efeito ocorreu concomitantemente com a redução da atividade da glutathione sintetase, de forma tempo-dependente, em células de neuroblastoma e glioblastoma (Amicarelli et al. 2003).

Sabe-se que a GSH pode ser liberada para o meio extracelular para servir como substrato para a síntese desse peptídeo nos neurônios (Dringen et al. 1999, Lee et al. 2010), e que a GSH quando adicionada ao meio extracelular é capaz de atenuar a resposta inflamatória em vários tipos de células (Lee et al. 2010). Em nosso trabalho, estes fatos podem explicar um efeito de curto prazo causado pela exposição ao metilglioxal, onde nós verificamos aumento do conteúdo de GSH extracelular em 1 hora (Figura 3, Capítulo 2). Além disso, o aumento dos níveis de GSH extracelular pode estar associado com uma diminuição do nível intracelular de GSH, já que foi

demonstrado que em condições de estresse oxidativo a GSH intracelular é ativamente secretada (Schulz et al. 2000, Dringen et al. 1999).

No sistema nervoso, a glicina serve como neurotransmissor inibitório e modulador dos receptores NMDA (Kemp e Leeson 1993). No entanto, este aminoácido também é usado como precursor para a síntese de diversos compostos, como creatina e o tripeptídeo, GSH (Dringen et al. 1998). A síntese de GSH ocorre pela ação de 2 enzimas citosólicas, glutamato cisteína ligase, que é a enzima limitante para síntese de GSH e glutatona sintetase, que promove a ligação de glicina a glutamilcisteína para formar o tripeptídeo (Meister e Anderson 1983).

Sabe-se que os astrócitos, diferente dos neurônios, são capazes de degradar a glicina através do sistema de clivagem da glicina, que é composto pela enzima glicina sintase. Através deste sistema ocorre a produção de CO₂, amônia e metileno tetrahydrofolato. Além disso, os astrócitos podem degradar glicina através da enzima serina hidroximetil transferase, a qual produz serina em uma reação reversível (Dringen e Hamprecht 1996, Gundersen et al. 2005). Quando a glicina é convertida em serina, pela enzima serina hidroximetil transferase, a serina produz seqüencialmente piruvato, acetil-CoA e CO₂ e, finalmente, lipídios neutros e CO₂ (dos Santos Fagundes et al. 2001).

Nossos resultados mostram que o metilglioxal aumenta a oxidação de glicina a CO₂ em 1 hora, mas diminui a síntese de proteínas em 1 e 3 horas (Figura 6, Capítulo 1). Este efeito causado pelo metilglioxal na redução da incorporação a proteínas pode explicar a diminuição no conteúdo de GSH nas células astrogliais C6. Outros estudos também encontraram redução do conteúdo de GSH como efeito do metilglioxal (Amicarelli et al. 2003, Di Loreto et al. 2008).

Além disso, nós observamos aumento da conversão de glicina a lipídios em 1 hora (Figura 6, Capítulo 1). O aumento da conversão de glicina a lipídios e da oxidação a CO₂ pode indicar um efeito de curto prazo do metilglioxal, que, provavelmente, está envolvido com a ativação das enzimas serina hidroximetil transferase e glicina sintase, o que poderia ocorrer devido a um aumento na captação de glicina pelas células astrogliais.

O sistema glioxalase tem um papel essencial na detoxificação do metilglioxal (Abordo et al. 1999). Aliado a isso, sabe-se que em astrócitos a atividade deste sistema está presente (Wu et al. 2001, Thornalley 1990). Em nosso trabalho, nós verificamos redução da atividade das enzimas glioxalase I e II, que foi observada somente em 24 horas de exposição ao metilglioxal (Figuras 2 e 3, Capítulo 1).

Prejuízo do sistema glioxalase também foi observado em outros estudos, que mostram que esse sistema estava diminuído em situações como o envelhecimento (Krautwald e Munch 2010, Kuhla et al. 2007) e em células tratadas com metilglioxal (Amicarelli et al. 2003, Di Loreto et al. 2008). No entanto, também foi demonstrado aumento na quantidade de proteína relativa à glioxalase em pacientes com DA em estágio inicial (Kuhla et al. 2007) e aumento da atividade das enzimas glioxalase I e II em linhagem celular de glioblastoma humano (ADF) (Amicarelli et al. 2003). Contudo, este efeito pode estar relacionado a uma resposta temporária, já que pacientes em estágios médio e tardio da DA houve uma redução na quantidade de proteína e diminuição da atividade da glioxalase I (Kuhla et al. 2007).

O prejuízo no funcionamento do sistema glioxalase pode causar um aumento na concentração intracelular de metilglioxal e, conseqüente, aumento da toxicidade causada por esse composto (Kuhla et al. 2007, Kuhla et al. 2006). O efeito tóxico do metilglioxal está relacionado com as reações de glicação, através das quais há a

formação de diferentes tipos de AGEs (Thornalley 2002, Thornalley et al. 2003). Nossos resultados demonstram que o metilglioxal foi capaz de aumentar o conteúdo de AGEs (dados não mostrados) nas células astrogliais C6. Contudo, este aumento foi observado somente em 24 horas de exposição ao metilglioxal, fato que ocorre concomitantemente com a redução da atividade do sistema glioxalase.

A excitotoxicidade glutamatérgica está relacionada com diversas doenças neurodegenerativas, como a DA, onde parece que a captação de glutamato astrocitária pode ser afetada (Fuller et al. 2010). No entanto, nós observamos um prejuízo na captação de glutamato apenas em 24 horas de exposição ao metilglioxal. Em curto prazo (1 hora) nós verificamos aumento da captação de glutamato em células astrogliais C6 (Figura 4, Capítulo 2). Este efeito de curto prazo do metilglioxal na captação de glutamato pode estar associado com um efeito dependente da liberação de GSH para o meio extracelular, já que nós observamos um aumento nesses dois parâmetros em 1 hora de exposição a este composto.

Além disso, o metilglioxal promoveu diminuição do conteúdo de GSH extracelular e da captação de glutamato em 24 horas (Figura 3 e 4, Capítulo 2). A hipótese relacionada a essa variação simultânea da captação de glutamato e do conteúdo extracelular de GSH é de que a GSH poderia modular a expressão e/ou a atividade dos transportadores de glutamato, já que um estudo indicou que a GSH extracelular pode modular os receptores de glutamato (Janaky et al. 1999). Tendo em vista que outro trabalho mostra que altos níveis de glutamato extracelular induzem a liberação de GSH a partir de cultura de astrócitos de ratos e esse efeito é independente da ativação de receptores de glutamato NMDA ou não-NMDA (Frade et al. 2008), mais pesquisas são necessárias para investigar esse possível efeito da GSH sobre a captação de glutamato em células astrogliais, bem como para elucidar os mecanismos envolvidos nesse efeito.

Mesmo assim, nós não descartamos que possa ocorrer um efeito direto do metilglioxal sobre o conteúdo de GSH e a depuração de glutamato, pois foi demonstrado que o glioxal, outro aldeído reativo capaz de formar AGEs, inativou o transportador de glutamato-1 (GLT-1) em cultura de astrócitos de ratos e diminuiu a captação de glutamato. Fato que foi atribuído à formação de um aduto: GLT-1 CML (carboximetil-lisina) (Kawaguchi et al. 2005).

Sabe-se que o fornecimento de GSH e de seus precursores para os neurônios parece estar afetado na DA e este fornecimento é, em grande parte, dependente do adequado funcionamento dos astrócitos (Calabrese et al. 2006). Neste contexto, a redução do conteúdo extracelular de GSH (em 24 horas) causado pelo metilglioxal em células astrogliais pode fortalecer a associação deste aldeído reativo com o desenvolvimento de alterações presentes nas doenças neurodegenerativas.

Estudos anteriores demonstraram que o metilglioxal pode inibir enzimas da via glicolítica e enzimas mitocondriais, além de diminuir o conteúdo de ATP e o potencial de membrana mitocondrial em células de neuroblastoma em 24 horas (de Arriba et al. 2006, de Arriba et al. 2007). Esses efeitos podem ajudar a explicar a redução nos níveis de GSH intracelular, já que ATP é essencial para a síntese de GSH. Além disso, a diminuição do conteúdo de ATP também pode reduzir a atividade da Na⁺/ K⁺-ATPase e, deste modo, atenuar a captação de glutamato nas células gliais C6.

Foi demonstrado que a captação de glutamato em astrócitos estimula a glicólise aeróbica devido à ativação da Na⁺/ K⁺-ATPase, que é causada por um aumento na concentração intracelular de sódio, o qual é co-transportado com glutamato (Pellerin e Magistretti 1994). Assim, o aumento da captação de glutamato verificado 1 hora após a exposição de metilglioxal nas células astrogliais C6, poderia estimular a atividade da Na⁺/ K⁺-ATPase, que, por sua vez, levaria ao aumento da glicólise. Essa idéia é

reforçada pela evidência de que os níveis de ATP foram significativamente maiores (15%) após 15 minutos de exposição ao metilglioxal na concentração de 300 μ M (de Arriba et al. 2006), embora não permaneçam elevados em 30 minutos, possivelmente por se tratar de uma linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), onde já foi demonstrado que esta linhagem é mais suscetível aos efeitos tóxicos do metilglioxal (Amicarelli et al. 2003).

Então, quando nós investigamos se o metabolismo da glicose poderia ser alterado em células gliais C6 expostas ao metilglioxal, nós observamos que este aldeído causou um aumento na captação de glicose e, provavelmente, em consequência, um aumento da oxidação de glicose a CO_2 em 1 hora (Figuras 4 e 5, Capítulo 1), porém este efeito desapareceu em 24 horas e em 3 horas, respectivamente. Estes achados corroboram com a hipótese de ativação da Na^+/K^+ -ATPase em 1 hora de tratamento com metilglioxal, bem como com o fato de que as doenças relacionadas aos AGEs surgem quando as células não podem controlar a formação de aldeídos e/ou não podem suprimir o efeito negativo do metilglioxal sobre o metabolismo celular (Dmitriev e Titov 2010), que foi observado em longo prazo, com a diminuição do sistema glioxalase e aumento da quantidade de AGEs.

Ainda em relação ao metabolismo da glicose, nós observamos que a conversão de glicose a lipídios aumenta em 3 horas (Figura 5, Capítulo 1). Nós podemos supor que, como o metilglioxal não alterou a oxidação de glicose em 3 horas, este substrato poderia ser utilizado para a síntese de lipídios, embora nós não saibamos se este aumento na conversão de glicose a lipídios foi apenas transitório devido a dificuldades técnicas para fazer este ensaio em 24 horas. Até o momento, não existem estudos que mostrem o efeito do metilglioxal sobre o metabolismo da glicose em células astrogliais. Contudo, um estudo que utilizou o glioxal verificou que este composto não alterou a

oxidação de glicose a CO_2 , em 1 hora, em fatias de cérebro de ratos jovens (Schmidt et al. 2010).

Nós pensamos que a oxidação de glicose a CO_2 possa estar reduzida em 24 horas, apesar de a captação de glicose apresentar somente tendência de redução em 24 horas (Figura 4, Capítulo 1). Esta idéia esta baseada no fato de que o metilglioxal foi capaz de prejudicar a função da célula astrogial C6, especialmente em longo prazo e, pois nós sustentamos o envolvimento do metilglioxal na DA, onde foi demonstrado que o metabolismo da glicose está diminuído (Freemantle et al. 2006, Alexander et al. 2002).

Apesar de o astrócito ser capaz de liberar lactato na fenda sináptica, a fim de que este seja utilizado como substrato energético para os neurônios (Pellerin 2005), essa célula também é capaz de utilizar lactato como substrato energético. A existência de dois *pools* de ambos lactato e piruvato já foi demonstrada (Bouzier et al. 1998), sendo que um *pool* estava intimamente ligado com o lactato exógeno e foi o principal combustível para o metabolismo oxidativo, e outro *pool* estava intimamente relacionado com a glicólise aeróbica.

Em nosso estudo, o metilglioxal não alterou a oxidação de lactato a CO_2 em 1 hora (Figura 7, Capítulo 1), nem em 3 horas (dados não mostrados) com a mesma concentração de glicose e lactato no meio (5 mM). Como se sabe que pode ocorrer competição entre lactato e glicose pelo metabolismo energético (Hertz et al. 2007, Bouzier et al. 1998, Bouzier-Sore et al. 2006), nós investigamos se modificando a relação glicose/lactato (2/1 ou 1/2), o metilglioxal poderia promover alterações na oxidação de lactato. Contudo, o metilglioxal também não alterou a oxidação de lactato nessas condições (dados não mostrados). Um estudo que analisou o efeito do glioxal em

fatias de cérebro de ratos jovens, por 1 hora, também não observou alteração na oxidação de lactato a CO₂ (Schmidt et al. 2010).

Outro parâmetro que, curiosamente, não foi alterado até 24 horas de exposição ao metilglioxal foi a secreção de S100B (Figura 5, Capítulo 2). Foi demonstrado que o resveratrol, composto redox-ativo, aumenta a secreção de S100B em células C6 (Quincozes-Santos et al. 2009) e que o peróxido de hidrogênio diminui a secreção de S100B em fatias hipocâmpais de ratos (de Almeida et al. 2008). Portanto, nós esperávamos que o metilglioxal, que pode ser considerado um agente oxidante, seria capaz de gerar mudanças na secreção de S100B. Contudo, como o mecanismo de secreção da S100B ainda é desconhecido e como não se sabe se o metilglioxal pode interagir diretamente com a proteína S100B ou pode modular sua secreção, mais estudos são necessários para compreender os efeitos deste composto sobre a secreção de S100B.

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que o metilglioxal (400 µM) não alterou a morte e a viabilidade celular até 24 horas de exposição. Também pudemos observar que o metilglioxal induziu um aumento na formação de espécies reativas e redução do conteúdo de GSH intracelular em curto (1 hora) e longo prazo (24 horas).

O conteúdo extracelular de GSH e a captação de glutamato aumentaram 1 hora após a exposição ao metilglioxal. Contudo, em 24 horas, o metilglioxal promoveu uma diminuição nos níveis de GSH extracelular e na captação de glutamato. A secreção de S100B não foi alterada pela exposição ao metilglioxal até 24 horas.

Além disso, em curto prazo, o metabolismo da glicose e glicina foi modificado pela exposição ao metilglioxal em células astrogliais C6. Verificou-se aumento da captação de glicose e da oxidação de glicose e de glicina a CO₂ em 1 hora, além de aumento da conversão de glicose e de glicina a lipídios em 3 horas e em 1 hora, respectivamente. Já a síntese protéica a partir de glicina diminuiu em 1 e 3 horas. A oxidação de lactato a CO₂ não foi alterada nos períodos estudados.

Mudanças no sistema glioxalase e na quantidade de AGEs somente foram observadas em exposição a longo prazo (24 horas). Verificou-se que o metilglioxal reduziu a atividade das enzimas glioxalase I e II e promoveu aumento do conteúdo de AGEs.

Os resultados fornecem evidências de que o metilglioxal prejudica o funcionamento das células astrogliais C6 através de alterações no metabolismo energético, que foram verificadas em curto prazo, e pelo aumento da produção de espécies reativas, redução do conteúdo de GSH intra e extracelular e redução da captação de glutamato, bem como redução do sistema de detoxificação glioxalase e aumento na quantidade de AGEs, que foram observados em longo prazo de exposição ao metilglioxal.

Em períodos de maior exposição ao metilglioxal (mais de 24 horas), as alterações observadas neste estudo poderiam ser exacerbadas, gerando um maior aumento da quantidade de metilglioxal intracelular e, assim, contribuindo com o surgimento ou agravamento de doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

- Abbott, N. J., Ronnback, L. and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 41-53.
- Abordo, E. A., Minhas, H. S. and Thornalley, P. J. (1999) Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*, **58**, 641-648.
- Ahmed, N., Thornalley, P. J., Luthen, R., Haussinger, D., Sebekova, K., Schinzel, R., Voelker, W. and Heidland, A. (2004) Processing of protein glycation, oxidation and nitrosation adducts in the liver and the effect of cirrhosis. *J Hepatol*, **41**, 913-919.
- Aleksandrovskii, Y. A. (1992) Antithrombin III, C1 inhibitor, methylglyoxal, and polymorphonuclear leukocytes in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Thromb Res*, **67**, 179-189.
- Alexander, C. L., Fitzgerald, U. F. and Barnett, S. C. (2002) Identification of growth factors that promote long-term proliferation of olfactory ensheathing cells and modulate their antigenic phenotype. *Glia*, **37**, 349-364.
- Amicarelli, F., Colafarina, S., Cattani, F., Cimini, A., Di Ilio, C., Ceru, M. P. and Miranda, M. (2003) Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radic Biol Med*, **35**, 856-871.
- Ankrah, N. A. and Appiah-Opong, R. (1999) Toxicity of low levels of methylglyoxal: depletion of blood glutathione and adverse effect on glucose tolerance in mice. *Toxicol Lett*, **109**, 61-67.
- Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. (2000) Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1708-1716.

- Beisswenger, P. J., Howell, S. K., O'Dell, R. M., Wood, M. E., Touchette, A. D. and Szwergold, B. S. (2001) alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care*, **24**, 726-732.
- Benda, P., Someda, K., Messer, J. and Sweet, W. H. (1971) Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg*, **34**, 310-323.
- Bernardinelli, Y., Magistretti, P. J. and Chatton, J. Y. (2004) Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14937-14942.
- Biessels, G. J., ter Laak, M. P., Kamal, A. and Gispen, W. H. (2005) Effects of the Ca²⁺ antagonist nimodipine on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res*, **1035**, 86-93.
- Blasko, I., Beer, R., Bigl, M., Apelt, J., Franz, G., Rudzki, D., Ransmayr, G., Kampfl, A. and Schliebs, R. (2004) Experimental traumatic brain injury in rats stimulates the expression, production and activity of Alzheimer's disease beta-secretase (BACE-1). *J Neural Transm*, **111**, 523-536.
- 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.
- Bouzier, A. K., Goodwin, R., de Gannes, F. M., Valeins, H., Voisin, P., Canioni, P. and Merle, M. (1998) Compartmentation of lactate and glucose metabolism in C6 glioma cells. A ¹³C and ¹H NMR study. *J Biol Chem*, **273**, 27162-27169.
- Brands, A. M., Kessels, R. P., de Haan, E. H., Kappelle, L. J. and Biessels, G. J. (2004) Cerebral dysfunction in type 1 diabetes: effects of insulin, vascular risk factors and blood-glucose levels. *Eur J Pharmacol*, **490**, 159-168.

- Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**, 813-820.
- Calabrese, V., Sultana, R., Scapagnini, G., Guagliano, E., Sapienza, M., Bella, R., Kanski, J., Pennisi, G., Mancuso, C., Stella, A. M. and Butterfield, D. A. (2006) Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 1975-1986.
- Casazza, J. P., Felver, M. E. and Veech, R. L. (1984) The metabolism of acetone in rat. *J Biol Chem*, **259**, 231-236.
- de Almeida, L. M., Leite, M. C., Thomazi, A. P., Battu, C., Nardin, P., Tortorelli, L. S., Zanotto, C., Posser, T., Wofchuk, S. T., Leal, R. B., Goncalves, C. A. and Gottfried, C. (2008) Resveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch Biochem Biophys*, **480**, 27-32.
- de Arriba, S. G., Krugel, U., Regenthal, R., Vissienon, Z., Verdaguer, E., Lewerenz, A., Garcia-Jorda, E., Pallas, M., Camins, A., Munch, G., Nieber, K. and Allgaier, C. (2006) Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity. *Free Radic Biol Med*, **40**, 779-790.
- de Arriba, S. G., Stuchbury, G., Yarin, J., Burnell, J., Loske, C. and Munch, G. (2007) Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells--protection by carbonyl scavengers. *Neurobiol Aging*, **28**, 1044-1050.
- de Souza, D. F., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L. S., Rigo, M. M., Gottfried, C., Leal, R. B. and Goncalves, C. A. (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol*, **206**, 52-57.

- Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R. and Baynes, J. W. (1998) Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **44**, 1139-1145.
- 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-1beta and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells. *Brain Res*, **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. *Int J Biochem Cell Biol*, **40**, 245-257.
- Dmitriev, L. F. and Titov, V. N. (2010) Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. *Ageing Res Rev*, **9**, 200-210.
- Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**, 637-668.
- Dong, Y. and Benveniste, E. N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia*, **36**, 180-190.
- dos Santos Fagundes, I., Rotta, L. N., Schweigert, I. D., Valle, S. C., de Oliveira, K. R., Huth Kruger, A., Souza, K. B., Souza, D. O. and Perr, M. L. (2001) Glycine, serine, and leucine metabolism in different regions of rat central nervous system. *Neurochem Res*, **26**, 245-249.
- Dringen, R., Gutterer, J. M. and Hirrlinger, J. (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, **267**, 4912-4916.

- Dringen, R. and Hamprecht, B. (1996) Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J Neurochem*, **67**, 1375-1382.
- Dringen, R., Pfeiffer, B. and Hamprecht, B. (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci*, **19**, 562-569.
- Dringen, R., Verleysdonk, S., Hamprecht, B., Willker, W., Leibfritz, D. and Brand, A. (1998) Metabolism of glycine in primary astroglial cells: synthesis of creatine, serine, and glutathione. *J Neurochem*, **70**, 835-840.
- Elias, P. K., Elias, M. F., D'Agostino, R. B., Cupples, L. A., Wilson, P. W., Silbershatz, H. and Wolf, P. A. (1997) NIDDM and blood pressure as risk factors for poor cognitive performance. The Framingham Study. *Diabetes Care*, **20**, 1388-1395.
- Eriksen, J. L. and Druse, M. J. (2001) Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. *Brain Res Dev Brain Res*, **131**, 9-15.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E. and Sczufca, M. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, **366**, 2112-2117.
- Frade, J., Pope, S., Schmidt, M., Dringen, R., Barbosa, R., Pocock, J., Laranjinha, J. and Heales, S. (2008) Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes--a possible neuroprotective mechanism? *J Neurochem*, **105**, 1144-1152.
- Freemantle, E., Vandal, M., Tremblay-Mercier, J., Tremblay, S., Blachere, J. C., Begin, M. E., Brenna, J. T., Windust, A. and Cunnane, S. C. (2006) Omega-3 fatty

- acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **75**, 213-220.
- Fuller, S., Steele, M. and Munch, G. (2010) Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease--do they neglect their neurosupportive roles? *Mutat Res*, **690**, 40-49.
- Garg, R., Chaudhuri, A., Munschauer, F. and Dandona, P. (2006) Hyperglycemia, insulin, and acute ischemic stroke: a mechanistic justification for a trial of insulin infusion therapy. *Stroke*, **37**, 267-273.
- Gasparini, L. and Xu, H. (2003) Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, **26**, 404-406.
- Gispén, W. H. and Biessels, G. J. (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci*, **23**, 542-549.
- Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*, **41**, 755-763.
- Gundersen, R. Y., Vaagenes, P., Breivik, T., Fonnum, F. and Opstad, P. K. (2005) Glycine--an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol Scand*, **49**, 1108-1116.
- Harris, M. I. (1998) Diabetes in America: epidemiology and scope of the problem. *Diabetes Care*, **21 Suppl 3**, C11-14.
- Harris, M. I., Flegal, K. M., Cowie, C. C., Eberhardt, M. S., Goldstein, D. E., Little, R. R., Wiedmeyer, H. M. and Byrd-Holt, D. D. (1998) Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care*, **21**, 518-524.

- Hertz, L., Peng, L. and Dienel, G. A. (2007) Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, **27**, 219-249.
- Huebschmann, A. G., Regensteiner, J. G., Vlassara, H. and Reusch, J. E. (2006) Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*, **29**, 1420-1432.
- Janaky, R., Ogita, K., Pasqualotto, B. A., Bains, J. S., Oja, S. S., Yoneda, Y. and Shaw, C. A. (1999) Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem*, **73**, 889-902.
- Kawaguchi, M., Shibata, N., Horiuchi, S. and Kobayashi, M. (2005) Glyoxal inactivates glutamate transporter-1 in cultured rat astrocytes. *Neuropathology*, **25**, 27-36.
- Kemp, J. A. and Leeson, P. D. (1993) The glycine site of the NMDA receptor--five years on. *Trends Pharmacol Sci*, **14**, 20-25.
- King, R. H. (2001) The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *Mol Pathol*, **54**, 400-408.
- Koehler, R. C., Gebremedhin, D. and Harder, D. R. (2006) Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol*, **100**, 307-317.
- Kopf, D. and Frolich, L. (2009) Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *J Alzheimers Dis*, **16**, 677-685.
- Korf, E. S., White, L. R., Scheltens, P. and Launer, L. J. (2006) Brain aging in very old men with type 2 diabetes: the Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes Care*, **29**, 2268-2274.

- Krautwald, M. and Munch, 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.
- Kroner, Z. (2009) The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern Med Rev*, **14**, 373-379.
- Kuhla, B., Boeck, K., Schmidt, A., Ogunlade, V., Arendt, T., Munch, G. and Luth, H. J. (2007) Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging*, **28**, 29-41.
- Kuhla, B., Luth, H. J., Haferburg, D., Boeck, K., Arendt, T. and Munch, G. (2005) Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **1043**, 211-216.
- Kuhla, B., Luth, H. J., Haferburg, D., Weick, M., Reichenbach, A., Arendt, T. and Munch, G. (2006) Pathological effects of glyoxalase I inhibition in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res*, **83**, 1591-1600.
- Lapolla, A., Reitano, R., Seraglia, R., Sartore, G., Ragazzi, E. and Traldi, P. (2005a) Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol Nutr Food Res*, **49**, 685-690.
- Lapolla, A., Traldi, P. and Fedele, D. (2005b) Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem*, **38**, 103-115.
- Lebed, Y. V., Orlovsky, M. A., Nikonenko, A. G., Ushakova, G. A. and Skibo, G. G. (2008) Early reaction of astroglial cells in rat hippocampus to streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci Lett*, **444**, 181-185.
- Lee, A. Y. and Chung, S. S. (1999) Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*, **13**, 23-30.

- Lee, M., Cho, T., Jantaratnotai, N., Wang, Y. T., McGeer, E. and McGeer, P. L. (2010) Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J*, **24**, 2533-2545.
- Li, S., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S. and Masliah, E. (1997) Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 901-911.
- Lyles, G. A. and Chalmers, J. (1992) The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol*, **43**, 1409-1414.
- Mangoura, D., Sakellaridis, N., Jones, J. and Vernadakis, A. (1989) Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res*, **14**, 941-947.
- Martins, S. I., Marcelis, A. T. and van Boekel, M. A. (2003) Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part I--reaction mechanism. *Carbohydr Res*, **338**, 1651-1663.
- Martins, S. I. and Van Boekel, M. A. (2003) Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part II--kinetic analysis. *Carbohydr Res*, **338**, 1665-1678.
- McGeer, P. L., Rogers, J. and McGeer, E. G. (2006) Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis*, **9**, 271-276.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem*, **52**, 711-760.
- Ministério da Saúde, Secretaria da Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis, Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico, Indicadores e

- Dados Básicos de Saúde, Governo Federal do Brasil, www.portal.saude.gov.br (2009).
- Narayan, K. M., Boyle, J. P., Thompson, T. J., Sorensen, S. W. and Williamson, D. F. (2003) Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *JAMA*, **290**, 1884-1890.
- Nemet, I., Turk, Z., Duvnjak, L., Car, N. and Varga-Defterdarovic, L. (2005) Humoral methylglyoxal level reflects glycemic fluctuation. *Clin Biochem*, **38**, 379-383.
- Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L. and Turk, Z. (2006) Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol Nutr Food Res*, **50**, 1105-1117.
- Ott, A., Stolk, R. P., Hofman, A., van Harskamp, F., Grobbee, D. E. and Breteler, M. M. (1996) Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia*, **39**, 1392-1397.
- Ott, A., Stolk, R. P., van Harskamp, F., Pols, H. A., Hofman, A. and Breteler, M. M. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*, **53**, 1937-1942.
- Parker, K. K., Norenberg, M. D. and Vernadakis, A. (1980) "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science*, **208**, 179-181.
- Pellerin, L. (2005) How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol*, **32**, 59-72.
- Pellerin, L. and Magistretti, P. J. (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10625-10629.
- 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.

- Qiu, W. Q. and Folstein, M. F. (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging*, **27**, 190-198.
- Quincozes-Santos, A., Andrezza, A. C., Goncalves, C. A. and Gottfried, C. (2010) Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells. *Toxicol In Vitro*, **24**, 916-920.
- Quincozes-Santos, A., Nardin, P., de Souza, D. F., Gelain, D. P., Moreira, J. C., Latini, A., Goncalves, C. A. and Gottfried, C. (2009) The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res*, **16**, 30-41.
- Richard, J. P. (1993) Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans*, **21**, 549-553.
- Ritchie, K. and Lovestone, S. (2002) The dementias. *Lancet*, **360**, 1759-1766.
- Robertson, R. P. and Harmon, J. S. (2006) Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med*, **41**, 177-184.
- Rodrigues, L., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Quilfeldt, J. A., Achaval, M. and Goncalves, C. A. (2009) Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis*, **17**, 193-202.
- Russell, A. P. (2004) Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **28 Suppl 4**, S66-71.
- Schemmel, K. E., Padiyara, R. S. and D'Souza, J. J. (2010) Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. *J Diabetes Complications*, **24**, 354-360.

- Schmidt, B., de Assis, A. M., Battu, C. E., Rieger, D. K., Hansen, F., Sordi, F., Longoni, A., Hoefel, A. L., Farina, M., Goncalves, C. A., Souza, D. O. and Perry, M. L. (2010) Effects of glyoxal or methylglyoxal on the metabolism of amino acids, lactate, glucose and acetate in the cerebral cortex of young and adult rats. *Brain Res*, **1315**, 19-24.
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J. and Dichgans, J. (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*, **267**, 4904-4911.
- Shamsi, F. A., Partal, A., Sady, C., Glomb, M. A. and Nagaraj, R. H. (1998) Immunological evidence for methylglyoxal-derived modifications in vivo. Determination of antigenic epitopes. *J Biol Chem*, **273**, 6928-6936.
- Shangari, N. and O'Brien, P. J. (2004) The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, **68**, 1433-1442.
- Sharma, M. and Gupta, Y. K. (2001) Effect of chronic treatment of melatonin on learning, memory and oxidative deficiencies induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **70**, 325-331.
- Shih, A. Y., Erb, H., Sun, X., Toda, S., Kalivas, P. W. and Murphy, T. H. (2006) Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. *J Neurosci*, **26**, 10514-10523.
- Silver, A. E., Beske, S. D., Christou, D. D., Donato, A. J., Moreau, K. L., Eskurza, I., Gates, P. E. and Seals, D. R. (2007) Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47(phox) expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation*, **115**, 627-637.
- Smyth, S. and Heron, A. (2006) Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med*, **12**, 75-80.

- Strachan, M. W., Reynolds, R. M., Marioni, R. E. and Price, J. F. (2011) Cognitive function, dementia and type 2 diabetes mellitus in the elderly. *Nat Rev Endocrinol*, **7**, 108-114.
- Thornalley, P. J. (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J*, **269**, 1-11.
- Thornalley, P. J. (2002) Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol*, **50**, 37-57.
- Thornalley, P. J., Battah, S., Ahmed, N., Karachalias, N., Agalou, S., Babaei-Jadidi, R. and Dawnay, A. (2003) Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J*, **375**, 581-592.
- Thornalley, P. J., Langborg, A. and Minhas, H. S. (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*, **344 Pt 1**, 109-116.
- Tressel, T., Thompson, R., Zieske, L. R., Menendez, M. I. and Davis, L. (1986) Interaction between L-threonine dehydrogenase and aminoacetone synthetase and mechanism of aminoacetone production. *J Biol Chem*, **261**, 16428-16437.
- Uribarri, J., Peppas, M., Cai, W., Goldberg, T., Lu, M., He, C. and Vlassara, H. (2003) Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. *J Am Soc Nephrol*, **14**, 728-731.
- Vander Jagt, D. L., Hassebrook, R. K., Hunsaker, L. A., Brown, W. M. and Royer, R. E. (2001) Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chem Biol Interact*, **130-132**, 549-562.

- 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.
- Vincent, A. M., McLean, L. L., Backus, C. and Feldman, E. L. (2005) Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *FASEB J*, **19**, 638-640.
- Walz, W. (1989) Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol*, **33**, 309-333.
- World Health International. *www.who.int* (2011).
- Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K. S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J. R., van den Enden, M., Kilo, C. and Tilton, R. G. (1993) Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, **42**, 801-813.
- Wu, L., Eftekharpour, E., Davies, G. F., Roesler, W. J. and Juurlink, B. H. (2001) Troglitazone selectively inhibits glyoxalase I gene expression. *Diabetologia*, **44**, 2004-2012.
- Xu, W. L., von Strauss, E., Qiu, C. X., Winblad, B. and Fratiglioni, L. (2009) Uncontrolled diabetes increases the risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *Diabetologia*, **52**, 1031-1039.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Ray, M., Reddy, M. K. and Sopory, S. K. (2005) Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 61-67.

- Yan, S. F., Ramasamy, R. and Schmidt, A. M. (2008) Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, **4**, 285-293.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., Atcheson, B., White, M. F., Kraegen, E. W. and Shulman, G. I. (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*, **277**, 50230-50236.