



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Jozimar Carlos Szczepanik

**EFEITOS DO METILGLIOXAL SOBRE O SISTEMA NERVOSO:
UMA INVESTIGAÇÃO NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL
EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis

2020

Jozimar Carlos Szczepanik

**EFEITOS DO METILGLIOXAL SOBRE O SISTEMA NERVOSO:
UMA INVESTIGAÇÃO NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL
EM CAMUNDONGOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de doutor em
Neurociências.
Orientador: Prof. Alcir Luiz Dafre, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Szczepanik, Jozimar Carlos
EFEITOS DO METILGLIOXAL SOBRE O SISTEMA NERVOSO : UMA
INVESTIGAÇÃO NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL EM CAMUNDONGOS
/ Jozimar Carlos Szczepanik ; orientador, Alcir Luiz
Dafre, 2020.
161 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Metilglioxal. 3. Memória. 4.
Dopamina. 5. Modelo animal. I. Dafre, Alcir Luiz. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Neurociências. III. Título.

Jozimar Carlos Szczepanik

**EFEITOS DO METILGLIOXAL SOBRE O SISTEMA NERVOSO:
UMA INVESTIGAÇÃO NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL
EM CAMUNDONGOS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Josiane Budni, Dra.
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Profa. Fernanda Hansen, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rui Daniel Schroder Prediger, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Fernando da Silva Fiorin, Dr.
Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em neurociências.

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Alcir Luiz Dafre, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

“Tente amar as perguntas, como salas trancadas e livros que agora estão escritos em uma língua muito estrangeira. Não procure agora as respostas, que não podem ser dadas, porque você não seria capaz de vivê-las. E o ponto é viver tudo. Viva as perguntas agora. Talvez você gradualmente, sem perceber, viva um dia distante até a resposta.”

(RILKE, 1903)



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre, pela amizade, confiança e a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, bem como, toda a competência e zelosa atenção dedicadas ao meu projeto ao longo de todo o curso de doutorado.

Aos meus, mais que colegas, amigos, que já integraram ou ainda continuam no Laboratório de Defesas Celulares (LabDef): Abel, Ariana, Barbara, Danielle, Gisele, Gudrian, Ingrid, Josiane, Juliano, Laura, Ligia, Luana, Luiz, Mauricio, Monique, Naissa, Rafael e Vicente.

Aos professores Boris J. C. U. Stambuk (Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras-UFSC) e Carlos Peres Silva (Laboratório de Bioquímica de Insetos-UFSC) e a todos os seus orientandos, pela amizade, profissionalismo, por terem proporcionado um ambiente de trabalho agradável e se esforçarem diariamente para o bem comum do "LabUNIDOS": Ângela, Bruna, Cristina, Eduardo Ribeiro, Eduardo Zanella, Fernanda, Julia, Junior, Leonardo, Theo e Wallace.

Aos servidores técnicos administrativos da UFSC: Nivaldo, ex-secretário do Programa de Pós-Graduação em Neurociências; E também Gabriela e Vilson, por garantirem o bom funcionamento do laboratório, mesmo em meio a tantas adversidades. A dedicação, cordialidade e profissionalismo de vocês são inspiradores!

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Com vocês pude fazer parte de uma verdadeira família científica, tanto dentro quanto fora da Universidade. Obrigado por estarem ao meu lado em tantos seminários, congressos, experimentos, confraternizações e nas organizações dos Cursos de Verão em Neurociências, dos Simpósios Integrados do Programa, das Semanas Nacionais do Cérebro e do Bio na Praça, no esforço sincero e valoroso de levar o conhecimento para fora dos campi. Ao longo do curso, tive o privilégio incomensurável de aprender e crescer muito, sempre amparado pelo auxílio gratuito e excelência profissional de todos vocês. Não poderia citar o nome de todos aqui, porém, sabemos que juntos vivenciamos descobertas extraordinárias e momentos memoráveis. Levo a amizade de vocês para a vida!

Aos meus pais, Severino e Maria – a quem sempre prestarei infinita gratidão – e a todos os meus familiares e amigos, por toda a parceria, generosidade e incomensurável apoio. E por compreenderem as minhas ausências e me incentivarem em minhas batalhas;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, a qual forneceu o mantimento financeiro pessoal que possibilitou a realização deste trabalho;

À UFSC e às suas repartições, que propiciaram subsídios e os recursos humanos, animais e materiais para a obtenção dos meios e serviços necessários que concretizaram o presente trabalho, em especial: À Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Biotério Central, Biblioteca Central, Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB); Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras (LBMBL); Laboratório de Neurociências e Comportamento (LANeC); e Laboratório de Neuroplasticidade (LANEP).

Muito obrigado!

RESUMO

O metilglioxal (MGO) é uma molécula dicarbonila reativa que pode ser gerada endogenamente ou adquirida de forma exógena. Alterações nos níveis de MGO e seu metabolismo podem induzir dano oxidativo, apoptose e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Estudos epidemiológicos têm associado o MGO a um maior risco de declínio cognitivo, demências, doença de Alzheimer e diabetes, sendo que esta última é fortemente ligada a comprometimentos cognitivos. Assim, no presente trabalho, foi hipotetizado que o MGO desencadeia comprometimento cognitivo e intervenções farmacológicas podem refletir na sua possível prevenção *in vivo*. Para avaliar os efeitos do MGO, camundongos fêmeas de 3 meses de idade da linhagem swiss foram tratados com administrações agudas (20, 50, 80 e 200 mg/kg) ou repetidas (10, 20, 25 e 50 mg/kg) e avaliadas ao longo do tratamento. Os animais foram tratados uma vez por dia durante até 11 dias, através de injeção intraperitoneal. Diferentes testes foram empregados para a avaliação das funções motoras, cognitivas, de emocionalidade e de sociabilidade nos camundongos. Os resultados revelaram que, em doses agudas mais altas (80 e 200 mg/kg), o MGO causou forte hipolocomoção, condizente com estimulação GABAérgica. O comportamento tipo-ansioso, atividade locomotora espontânea, agilidade vertical, força e coordenação motora não foram alterados pelo tratamento repetido com as diferentes doses. O MGO foi capaz de induzir comportamento tipo-depressivo e prejuízos na memória de reconhecimento, memória espacial, memória aversiva e memória de trabalho, em paradigmas de curto e longo prazo. Os níveis plasmáticos de MGO não diferiram do grupo controle 24 h após a última administração. O tratamento repetido com MGO diminuiu os níveis da enzima limitante da sua detoxificação – glioxalase 1 – no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais. Além disso, os animais tratados com MGO apresentaram níveis reduzidos de dopamina no córtex pré-frontal. Esse resultado pode estar associado com um desempenho diminuído da memória de trabalho. Em uma segunda abordagem, os prejuízos cognitivos causados pelo MGO foram investigados em cotratamento com as drogas: bupropiona, cetamina, muscimol, bicuculina e FPS-ZM1. Bupropiona, cetamina, muscimol e FPS-ZM1 foram capazes de prevenir parcialmente o déficit da memória de trabalho observada. O FPS-ZM1 – antagonista do receptor para AGEs (RAGE) – foi capaz de prevenir os déficits causados pelo MGO sobre a memória de trabalho e memória aversiva de curto prazo. Porém, o FPS-ZM1 não evitou o prejuízo sobre a memória espacial de longo prazo. Dessa forma, o presente trabalho apresenta evidências de efeitos deletérios consistentes, tanto fisiológicos quanto comportamentais, do MGO. O MGO causou déficits cognitivos na memória de curto e longo prazo nos camundongos. Os níveis de DA reduzidos no córtex pré-frontal dos animais tratados sugerem possíveis novos efeitos e mecanismos de ação do MGO no sistema nervoso central, afetando o sistema dopaminérgico e perturbando a memória de trabalho, bem como, processos cognitivos ligados à inteligência fluída em humanos. Os resultados também sugerem o bloqueio de RAGE, como um importante alvo terapêutico a ser usado visando a restauração de déficits cognitivos causados pelo estresse dicarbonílico.

Palavras-chave: Metilglioxal. Sistema nervoso central. Glioxalase. Memória. Prejuízo cognitivo. Dopamina. Modelo animal.

ABSTRACT

Methylglyoxal (MGO) is a reactive dicarbonyl molecule that can be generated endogenously or obtained from exogenous sources. Changes in MGO levels and metabolism can cause oxidative damage, apoptosis and the formation of advanced glycation end products (AGEs). Epidemiological studies have linked MGO to increased risk of cognitive decline, dementia, Alzheimer's disease and diabetes, the latter is strongly associated with cognitive impairment. Thus, in the present work, it was hypothesized that MGO triggers cognitive impairment and pharmacological interventions may reflect on its possible prevention *in vivo*. To assess the effects of MGO, 3-month-old swiss female mice were treated with MGO in acute administration (20, 50, 80 and 200 mg/kg) or repeated treatment (10, 20, 25 and 50 mg/kg) and investigated throughout treatment. Mice were treated once a day for up to 11 days, by intraperitoneal injection. Different tests were used to evaluate motor function, cognition, mood and sociability in mice. Results showed that at higher acute doses (80 and 200 mg/kg) MGO caused strong hypolocomotion, related to GABAergic stimulation. Anxiety-like behavior, spontaneous locomotor activity, vertical agility, strength and motor coordination were not altered by the repeated treatment and with different doses. MGO was capable to induce depressive-like behavior and impaired recognition memory, spatial memory, aversive memory and working memory, in short and long term paradigms. Plasma levels of MGO did not differ from the control group 24 h after the last administration. The repeated treatment with MGO decreased the levels of the rate-limiting enzyme of MGO detoxification – glyoxalase 1 – in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. In addition, mice treated with MGO showed decreased levels of dopamine in the prefrontal cortex. This result could be associated with the decreased working memory performance. In a second approach, the cognitive impairment caused by MGO were investigated. Mice were co-treated with the drugs: bupropion, ketamine, muscimol, bicuculline and FPS-ZM1. Bupropion, ketamine, muscimol and FPS-ZM1 were able to partially prevent the observed working memory deficit. FPS-ZM1 – receptor for AGEs (RAGE) antagonist – was able to prevent the effects caused by MGO on working memory and short-term aversive memory. However, FPS-ZM1 did not prevent the damage to long-term spatial memory. Thus, the present work presents evidence of consistent deleterious effects, both physiological and behavioral, caused by MGO. MGO caused cognitive deficits in short and long term memory in mice. The decreased DA levels in the prefrontal cortex of mice suggested possible new effects and mechanisms of action of MGO in the brain, affecting the dopaminergic system and disturbing the working memory, as well as cognitive processes linked to fluid intelligence in humans. The results also suggested that the blockade of RAGE could be an important therapeutic target to be used in order to restore cognitive deficits caused by dicarbonyl stress.

Keywords: Methylglyoxal. Central nervous system. Glyoxalase. Memory. Cognitive dysfunction. Dopamine. Animal model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do metilglioxal (C ₃ H ₄ O ₂)	02
Figura 2 – Níveis de metilglioxal em diferentes regiões do encéfalo	04
Figura 3 – Fórmula estrutural do FPS-ZM1 (C ₂₀ H ₂₂ ClNO)	10
Figura 4 – Respostas de ativação ou bloqueio do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) na célula	11
Figura 5 – Sistema das glioxalases	13
Figura 6 – Formação hipocampal e fases da formação da memória	18
Figura 7 – Modelo de interação funcional hipocampo-córtex pré-frontal	20
Figura 8 – Escala temporal exibindo os testes comportamentais do protocolo de tratamento agudo da FASE I	32
Figura 9 – Escalas temporais exibindo os testes comportamentais do protocolo de tratamento repetido de 11 dias da FASE II	34
Figura 10 – Escalas temporais exibindo os testes comportamentais do protocolo de tratamento repetido de 11 dias da FASE III	36
Figura 11 – Teste do campo aberto	38
Figura 12 – Teste de suspensão pela cauda	39
Figura 13 – Teste de barras horizontais	40
Figura 14 – Teste do poste	41
Figura 15 – Teste de interação social	42
Figura 16 – Testes de realocação de objeto e reconhecimento de objeto	45
Figura 17 – Teste de alternância espontânea	46
Figura 18 – Teste de esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	48
Figura 19 – Efeitos do metilglioxal (20, 80, 200 mg/kg, i. p.) sobre a atividade locomotora de camundongos, após tratamento agudo (4 h)	53
Figura 20 – Efeitos do metilglioxal (50 mg/kg, i. p.) sobre a atividade locomotora de camundongos, após tratamento agudo (4 h)	54
Figura 21 – Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) em camundongos sobre a atividade locomotora	56
Figura 22 – Efeitos do metilglioxal sobre a coordenação motora de camundongos	58
Figura 23 – Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a força de camundongos ..	59

Figura 24 – Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a interação social de camundongos	60
Figura 25 – Efeitos do metilglioxal (20 mg/kg, i. p.) sobre o comportamento tipo-depressivo em camundongos	61
Figura 26 – Efeitos do metilglioxal (20 mg/kg, i. p.) sobre a memória espacial de curto prazo (90 min) de camundongos, no teste de realocação de objeto	63
Figura 27 – Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a memória espacial e de reconhecimento de longo prazo (24 h) de camundongos	65
Figura 28 – Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a memória de trabalho de camundongos	66
Figura 29 – Efeitos do metilglioxal sobre a memória aversiva de camundongos	68
Figura 30 – Efeitos do tratamento com metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre os níveis proteicos da glicoxalase 1 (Glo1) e glicoxalase 2 (Glo2)	71
Figura 31 – Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a atividade enzimática da glicoxalase 1 (Glo1) no córtex pré-frontal de camundongos	72
Figura 32 – Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre os níveis de monoaminas	75
Figura 33 – Escala temporal dos testes comportamentais de cotratamentos repetidos em camundongos	77
Figura 34 – Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal sobre a atividade locomotora de camundongos	78
Figura 35 – Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal sobre a memória espacial de longo prazo (24 h) de camundongos	80
Figura 36 – Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal sobre a memória de trabalho de camundongos	82
Figura 37 – Escala temporal dos testes comportamentais de cotratamentos repetidos com FPS-ZM1 e metilglioxal em camundongos	83
Figura 38 – Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a atividade locomotora de camundongos	84
Figura 39 – Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória espacial de longo prazo (24 h) de camundongos	86
Figura 40 – Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória de trabalho de camundongos	87

Figura 41 – Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória aversiva de curto prazo (1,5 h) de camundongos	88
Figura 42 – Dopamina e vias dopaminérgicas	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sumário dos principais resultados dos testes comportamentais após tratamento com camundongos	89
Quadro 2 – Sumário dos principais resultados das análises bioquímicas após tratamento com camundongos	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal (MGO) no campo aberto	56
Tabela 2 – Níveis de metilglioxal (MGO) no plasma 24 h após a última injeção	69
Tabela 3 – Efeitos do metilglioxal (MGO) sobre os níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos após 11 dias de tratamento repetido	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-MT – 3-metoxitiramina

4-HNE – 4-hidroxinonenal

5-HT – Serotonina

6-OHDA – 6-hidroxi-dopamina

A β – Peptídeo beta-amilóide

ADHs – Aldeído desidrogenases

ADTIQ – 1-acetil-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina

AGEs – Produtos finais de glicação avançada (do inglês “*advanced glycation end products*”)

AKRs – Aldo-ceto redutases

ATP – Trifosfato de adenosina

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês “*brain-derived neurotrophic factor*”)

BHE – Barreira hematoencefálica

BS – tronco encefálico (do inglês “*brain stem*”)

CA – “*cornu ammonis*”, do latim

Ce – Cerebelo

DA – Dopamina (C₈H₁₁NO₂)

DAT – Transportador de dopamina (do inglês “*dopamine transporter*”)

DG – Giro denteado (do inglês “*dentate gyrus*”)

dHPC – Hipocampo dorsal (do inglês “*dorsal hippocampus*”)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOPAC – Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético

EDTA – Ácido etilendiaminatetraacético

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GABA_AR – Receptores do ácido γ -aminobutírico do tipo A

GPx – Glutaciona peroxidase

GR – Glutaciona redutase

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico

Hip – Hipocampo

HMGB1 – Proteína HMGB1 (do inglês “*High Mobility Group Box 1*”)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
HVA – Ácido homovalínico
i. p. – Via Intraperitoneal
i. c. v. – Injeção intracerebroventricular
IL-1 β – Interleucina 1 beta
LEC – Córtex entorrinal (do inglês “*entorhinal cortex*”)
LTP – Potenciação de longa duração (do inglês “*Long Term Potentiation*”)
mAPP – Proteína precursora amilóide
MCI – Prejuízo/Comprometimento cognitivo leve (do inglês “*mild cognitive impairment*”)
MDA – Malondialdeído
MGO – metilglioxal (C₃H₄O₂)
mPFC – Córtex pré-frontal medial (do inglês “*medial prefrontal cortex*”)
mRNA – RNA mensageiro (do inglês “*messenger RNA*”)
NA – Noradrenalina
NAc – Núcleo accumbens
NET – Transportador de noradrenalina (do inglês “*norepinephrine transporter*”)
NF κ B – Fator nuclear kappa B (do inglês “*nuclear factor kappa B*”)
pH – potencial Hidrogeniônico
PFC – Córtex pré-frontal (do inglês “*prefrontal cortex*”)
PRC – Córtex perirrinal (do inglês “*perirhinal cortex*”)
PVDF – Fluoreto de polivinilideno (do inglês “*Polyvinylidene fluoride*”)
Ponceau S – Corante ácido vermelho (do inglês “*Acid Red 112*”)
RAGE – Receptor para produtos finais de glicação avançada (do inglês “*receptor for advanced glycation end products*”)
Re – Núcleo reuniens
S100 – Calgranulinas S100
s. c. – Via subcutânea
SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SNC – Sistema nervoso central
Str – Estriado
TDAH – Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade
TDM – Transtorno depressivo maior
TEA – Transtorno do espectro autista

TRPA1 – Receptor de potencial transitório anquirina 1 (do inglês “*transient receptor potential ankyrin 1*”)

TH – Tirosina hidroxilase

TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha

vHPC – Hipocampo ventral (do inglês “*ventral hippocampus*”)

VMAT-2 – Transportador de monoamina vesicular 2

v. o. – Via oral

WB – Encéfalo total (do inglês “*Whole brain*”)

ZM1 – FPS-ZM1 (C₂₀H₂₂ClNO)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Relação entre o sistema nervoso central e o metilglioxal	01
1.2. Alterações fisiológicas associadas ao estresse dicarbonílico	05
1.2.1. O metilglioxal como agente estressor	05
1.2.2. Efeitos secundários da glicação e suas implicações patológicas	08
1.3. Sistemas de detoxificação do metilglioxal	12
1.4. Aspectos básicos sobre a memória	15
1.4.1. Diferenças entre os tipos de memória	16
1.4.2. Estruturas e mecanismos de memória	17
1.5. O envolvimento do metilglioxal em doenças e a sua investigação através de modelos animais	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. HIPÓTESE	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo geral	28
4.2. Objetivos específicos	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1. Animais	30
5.2. Tratamentos	30
5.3. Desenho experimental	31

5.3.1. FASE I: Protocolo agudo	32
5.3.2. FASE II: Protocolo repetido	33
5.3.3. FASE III: Protocolo repetido	35
5.4. Testes comportamentais	37
5.4.1. Teste do campo aberto	37
5.4.2. Teste de suspensão pela cauda	38
5.4.3. Teste de barras horizontais	39
5.4.4. Teste do poste	40
5.4.5. Teste de interação social	41
5.4.6. Teste de realocação de objeto	43
5.4.7. Teste de reconhecimento de objeto	44
5.4.8. Teste de alternância espontânea	45
5.4.9. Teste de esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	47
5.5. Análises bioquímicas	48
5.5.1. Metilglioxal plasmático	48
5.5.2. Quantificação de monoaminas encefálicas	49
5.5.3. Conteúdo de proteínas do sistema das glioxalases	49
5.5.4. Avaliação da peroxidação lipídica por dot blotting	50
5.5.5. Atividade da enzima glioxalase 1 (Glo1)	50
5.6. Análise estatística	51
6. RESULTADOS	52
6.1. PARTE 1: Avaliação comportamental I	52
6.1.1. Efeitos do tratamento agudo com metilglioxal sobre a atividade locomotora de camundongos	52
6.1.2. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal sobre a atividade locomotora de camundongos	55
6.1.3. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a atividade locomotora, força e coordenação motora de camundongos	57
6.1.4. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a interação social de camundongos	59

6.1.5. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre o comportamento tipo-depressivo de camundongos	61
6.1.6. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a memória espacial de curto prazo de camundongos	62
6.1.7. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a memória de longo prazo de camundongos	64
6.1.8. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a memória de trabalho de camundongos	66
6.1.9. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a memória aversiva de camundongos	67
6.2. PARTE 2: Avaliação bioquímica	69
6.2.1. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre seus níveis plasmáticos de metilglioxal em camundongos	69
6.2.2. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre os níveis proteicos do sistema das glioxalases no sistema nervoso central de camundongos	70
6.2.3. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a atividade enzimática da glioxalase 1 no córtex pré-frontal de camundongos	72
6.2.4. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre parâmetros de dano oxidativo celular no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos	73
6.2.5. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre os níveis de monoaminas no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos	74
6.3. PARTE 3: Avaliação comportamental II	76
6.3.1. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina	77
6.3.1.1. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina sobre a atividade locomotora de camundongos	78
6.3.1.2. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina sobre a memória de longo prazo de camundongos	79
6.3.1.3. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina sobre a memória de trabalho de camundongos	81

6.3.2. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com FPS-ZM1, um antagonista do RAGE	83
6.3.2.1. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a atividade locomotora de camundongos	84
6.3.2.2. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória espacial de longo prazo de camundongos	85
6.3.2.3. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória de trabalho de camundongos	87
6.3.2.4. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória aversiva de curto prazo de camundongos	88
6.4. Sumário de resultados	89
7. DISCUSSÃO	91
8. CONCLUSÃO	109
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	112
ANEXOS	113
ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC)	114
REFERÊNCIAS	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Relação entre o sistema nervoso central e o metilglioxal

O sistema nervoso central (SNC) é um tecido caracterizado por alta demanda energética. Embora o encéfalo humano, por exemplo, represente cerca de apenas 2% de toda a massa corporal (MOLINA & DIMAIO, 2012), ele é responsável pelo consumo médio de 20% de todo o oxigênio fisiologicamente disponível para o corpo em estado de repouso (MINK et al., 1981). Assim, uma vez que os encéfalos dos mamíferos apresentam uma grande densidade de células nervosas de alta demanda energética, como os neurônios, o consumo de energia assume proporções muito superiores, se comparado a outros tecidos e organismos. Portanto, acredita-se que evolutivamente, o alto metabolismo energético do SNC associado ao aumento do número de células nervosas, tenha contribuído para a complexidade da plasticidade sináptica e à ampla variedade de comportamentos nas espécies (BORDONE et al., 2019). O principal processo que favorece o alto consumo energético do SNC saudável e consciente é a transmissão sináptica, pela restauração e manutenção de gradientes iônicos através das membranas celulares, que são dissipados por potenciais de ação e processos de sinalização pós-sinápticos; bem como, a captação e reciclagem de neurotransmissores (HARRIS et al., 2012; BORDONE et al., 2019). As células neuronais representam as maiores consumidoras energéticas, porém, os astrócitos são responsáveis pelo consumo estimado de 20% de toda a energia do encéfalo em atividade (HYDER et al., 2013).

A glicose é o principal substrato utilizado para a obtenção de energia no SNC (MINK et al., 1981). Em mamíferos, a dieta é a principal fonte de glicose, sendo que o encéfalo humano é responsável pelo consumo médio de 25% de toda a glicose corporal (MOORE et al., 2012; BORDONE et al., 2019). Nas células, a glicose pode ser catabolizada através da via glicolítica (ou glicólise) formando diferentes intermediários e trifosfato de adenosina (ATP). Porém, a glicólise não é uma via metabólica inócua, uma vez que, inevitavelmente, pode produzir metilglioxal (MGO) como subproduto (KALAPOS, 2008a; ALLAMAN et al., 2015).

O MGO (2-oxopropanal; $C_3H_4O_2$) é um α -oxoaldeído altamente reativo e tóxico (Fig. 1). É formado sob condições normais do metabolismo e pode se ligar e modificar proteínas, perturbando funções celulares. O MGO pode ser formado através de uma reação de dismutação espontânea, na qual há a fragmentação e eliminação de fosfato a partir da forma fosfo-eno-

diolato de dois metabólitos da glicólise, as trioses-fosfato: gliceraldeído-3-fosfato e fosfato de di-hidroxiacetona (THORNALLEY, 1996).

O MGO também pode ser formado de forma enzimática de diferentes maneiras: a) através da ação de aminas oxidases (KALAPOs, 1999) e principalmente pela oxidação da aminoacetona formada no catabolismo da treonina (LYLES & CHALMERS, 1992; THORNALLEY, 1996); b) pelo escape do fosfo-eno-diolo do sítio ativo da triosefosfato isomerase (POMPLIANO ET AL., 1990); c) a partir de acetona pelo citocromo P450 2E1 que catalisa a formação de hidroxiacetona e MGO (KOOPI & CASAZZA, 1985); d) em processos de peroxidação lipídica (SHIBAMOTO, 2006); e) pela degradação de proteínas glicadas pela glicose e também pela degradação de monossacarídeos (THORNALLEY et al., 1999); f) no metabolismo dos aminoácidos glicina e tirosina (KALAPOs, 1999); e g) pela enzima metilglioxal sintase em procariotos, que catalisa a formação de MGO a partir do fosfato de di-hidroxiacetona (COOPER & ANDERSON, 1970; RAY & RAY, 1981).

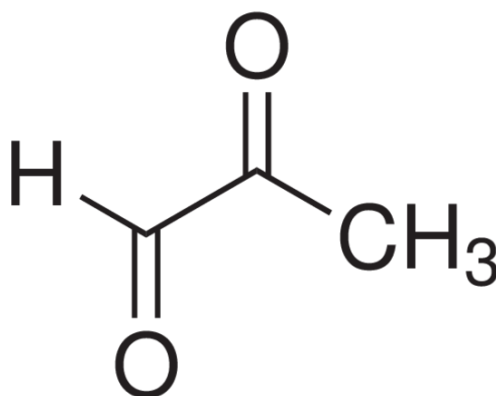


Figura 1. Fórmula estrutural do metilglioxal (C₃H₄O₂). (Nome IUPAC: 2-oxopropanal – 72.06 g/mol) (adaptado de www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019).

Embora existam diferentes maneiras de formação, a fragmentação não enzimática das trioses-fosfato, como ocorre na glicólise, é considerada a principal responsável por formar MGO nas células de mamíferos, considerando condições normais de glicemia (3,5 – 5,5 mmol/L) (THORNALLEY, 1993; 1996; GÜEMES et al., 2016). Uma vez que a glicólise é uma via de importância primária presente em todos os tecidos, a formação do MGO ocorre em todas as células e organismos (KALAPOs, 2008a). Isso significa que a formação periférica e até a circulação sistêmica do MGO podem acessar e afetar o SNC, uma vez que é uma molécula capaz de se difundir através da membrana plasmática, portanto, capaz de permear também a barreira hematoencefálica (BHE) (DISTLER et al., 2012a). Cerca de 0,1-0,4% dos

intermediários glicolíticos da célula são direcionados para a formação de MGO (KALAPOs, 2008a). Em humanos, a taxa de formação sistêmica do MGO em condições não patológicas é de aproximadamente 120 $\mu\text{mol}/\text{dia}$. Embora esse valor represente uma ínfima parte das trioses-fosfato produzidas na glicólise, sua formação é relevante devido à sua alta toxicidade (THORNALLEY, 1988; PHILLIPS & THORNALLEY, 1993; KALAPOs, 2008a).

O MGO também pode ser incorporado a partir da dieta, entretanto, é rapidamente degradado ou conjugado a outros componentes da dieta durante o processo de digestão no intestino e, portanto, pode não exercer influência significativa sobre os níveis de MGO *in vivo* (DEGEN et al., 2013). No entanto, nos alimentos e bebidas, o MGO é formado durante o processamento, cozimento e também pelo armazenamento prolongado dos mesmos. E a ingestão de baixas doses de MGO por um período prolongado foi associado a alterações degenerativas nos tecidos e também por ser capaz de apresentar atividade anticâncer (NEMET et al., 2006).

Em células de mamíferos e plantas, a concentração média do MGO foi encontrada entre 1-4 μM (RABBANI & THORNALLEY, 2015). Porém, o MGO apresenta diferenças de concentração dependentes da especificidade do tecido. Em decorrência do alto consumo energético do SNC, a glicólise apresenta uma maior atividade em relação a outros tecidos, o que por sua vez, promove uma maior produção de MGO no SNC quando comparados aos demais tecidos de mamíferos (THORNALLEY, 1988; PHILLIPS & THORNALLEY, 1993). Como evidência, nos estudos com humanos saudáveis, nos quais foram realizadas dosagens do MGO no plasma sanguíneo, as concentrações de MGO ficaram em torno de 100-200 nM (RABBANI & THORNALLEY, 2014; 2019) ou em 100-500 nM (DEGEN et al., 2013; KALAPOs, 2013). Porém, as concentrações de MGO, quando dosadas a partir do líquido cefalorraquidiano, são muito maiores. Podem atingir em torno de 10000 nM, ou seja, concentrações até 100 vezes maiores que no plasma (KUHLA et al., 2005).

Recentemente, os níveis de MGO foram mensurados em diferentes regiões do encéfalo de camundongos C57BL6/J com 8 meses de idade. Observou-se que as concentrações diferiram marcadamente dependendo da estrutura. Com destaque, os níveis de MGO no tronco encefálico ($0,376 \pm 0,028 \mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína) foram encontrados aproximadamente 10 a 50 vezes maiores que qualquer outra estrutura, tal como o hipocampo ($0,032 \pm 0,010 \mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína) ou córtex pré-frontal ($0,006 \pm 0,002 \mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína) (Fig. 2). Acredita-se que essas diferenças nos níveis de MGO encefálicos possam refletir diferenças específicas da sua função fisiológica e do metabolismo glicolítico em cada região do encéfalo (KOIKE et al., 2019).

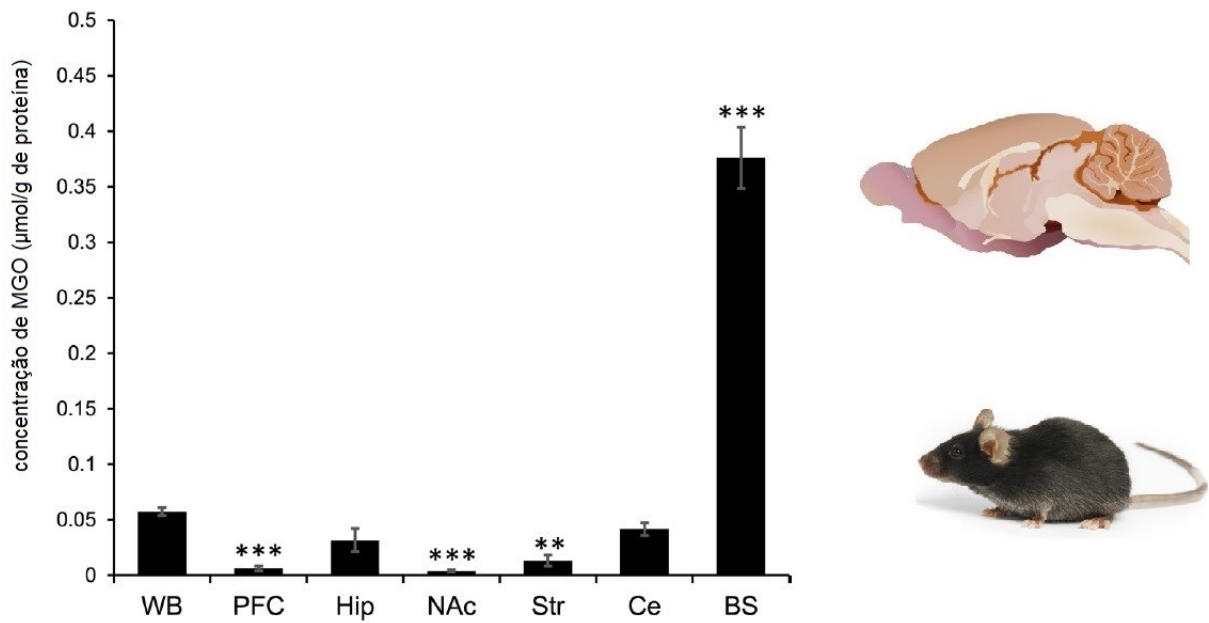


Figura 2. Níveis de metilglioxal em diferentes regiões do encéfalo. (WB: encéfalo total; PFC: córtex pré-frontal; Hip: hipocampo; NAc: núcleo accumbens; Str: estriado; Ce: cerebelo; BS: tronco encefálico) de camundongos C57BL6/J de 8 meses de idade. Os valores indicam média \pm erro padrão. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferente dos níveis de WB (teste t de Student) (adaptado de KOIKE et al., 2019).

1.2. Alterações fisiológicas associadas ao estresse dicarbonílico

1.2.1. O metilglioxal como agente estressor

O estresse dicarbonílico é causado por um desequilíbrio na formação e metabolismo de metabólitos dicarbonílicos, tais como o MGO, o glioxal (GO), a 3-desoxiglucosona (3-DG), etc. Ineficiências nos sistemas de detoxificação do MGO, bem como, o aumento da ingestão do mesmo, podem causar o seu acúmulo nos tecidos, contribuindo assim com o estresse dicarbonílico (RABBANI et al., 2016).

A curto prazo, o acúmulo de MGO acima dos níveis fisiológicos é altamente prejudicial ao organismo, uma vez que ele reage rapidamente *in vivo* (THORNALLEY & RABBANI, 2011). Quão logo o MGO é formado no citosol, ele pode se ligar de forma espontânea com a molécula antioxidante glutatona (GSH) em sua forma reduzida formando hemitioacetil. De forma aguda, um acúmulo intracelular de MGO pode reduzir drasticamente os níveis de GSH e assim diminuir momentaneamente as defesas celulares contra danos oxidativos, uma vez que a GSH é recuperada ao final do ciclo catalítico das glioxalases (KALAPOUS, 2008b). Embora essa diminuição seja breve ou transiente, isso não deixa de representar um risco, pois o SNC é um tecido especialmente vulnerável a danos causados por espécies reativas, devido ao alto consumo de oxigênio pelo encéfalo e por apresentar um conteúdo abundante de lipídios, que são sítios suscetíveis de oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985).

Os efeitos deletérios indiretos do MGO são mais largamente estudados, porém um campo pouco investigado e que agora vem sendo explorado são os seus efeitos diretos em outros alvos moleculares. O próprio MGO pode agir diretamente nos neurônios alterando a atividade sináptica por despolarização. Isso se tornou evidente depois da descoberta de que o MGO pode agir como um agonista parcial competitivo de receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA) do tipo A (GABA_AR), possuindo 1/3 da força de ativação de seu neurotransmissor clássico (DISTLER et al., 2012a). Os GABA_AR são membros da superfamília de canais iônicos dependente de ligantes. Constituem um grupo muito heterogêneo de receptores que formam oito subfamílias a partir das oito subunidades diferentes (α , β , γ , δ , ϵ , θ , π e ρ) com suas respectivas variantes, que podem se unir em combinações diferentes de modo a formar um poro transmembrana de cinco subunidades. Assim, na célula formam um canal heteropentamérico permeável a cloreto (Cl⁻), somado a quatro domínios transmembrana hidrofóbicos (TM1–TM4). Além disso, cada subunidade do canal também contém um grande domínio intracelular, permitindo várias interações que modulam a atividade do receptor. O GABA, seu ligante

endógeno, é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, que após a ativação do GABA_AR conduz Cl⁻ através de seu poro, resultando em hiperpolarização do neurônio. Isso causa um efeito inibitório sobre a neurotransmissão, diminuindo a probabilidade da ocorrência de um potencial de ação. Apesar da heterogeneidade de suas subunidades, a maioria dos GABA_AR expressos no encéfalo consistem de duas subunidades α , duas subunidades β e uma subunidade γ (JOHNSTON, 2005; CHUA & CHEBIB, 2017; ÇIÇEK, 2018).

Além disso, o GABA_AR contém várias regiões de ligação alostérica, que modulam a atividade do receptor. Estas são alvos de várias drogas, como benzodiazepínicos, barbitúricos, anestésicos gerais, etanol, picrotoxina, e esteróides neuroativos (JOHNSTON, 2005; ÇIÇEK, 2018). Além do MGO, o sítio de ligação ao GABA do GABA_AR é também o local de ligação de várias drogas, como muscimol e bicuculina (DISTLER et al., 2012a; CHUA & CHEBIB, 2017). O muscimol é um isoxazol psicoativo naturalmente proveniente de *Amanita muscaria* e de outros cogumelos semelhantes. É considerado um agonista notavelmente seletivo para receptores inibitórios GABAérgicos (JOHNSTON, 2014). Já a bicuculina, é uma droga antagonista. É um alcaloide proveniente de *Dicentra cucullaria* e age seletivamente em GABA_AR (JOHNSTON, 2013). De uma forma geral, dados da literatura usando modelos murinos têm mostrado que a ativação do GABA_AR com o agonista muscimol pode causar prejuízos na memória, enquanto o seu bloqueio com o antagonista bicuculina é capaz de agir de maneira a restaurar prejuízos na memória, e em determinados casos, até melhorar a retenção de memória. (BRIONI & MCGAUGH, 1988; ZARRINDAST et al., 2002; NASEHI et al., 2018; MOUSAVI MAJD et al., 2018).

O MGO também pode modular a atividade de outras proteínas, como o canal iônico de sódio dependente de voltagem e vinculado à hiperalgesia, nomeado de Nav1.8, com relevância na neuropatia diabética (BIERHAUS et al., 2012). O MGO também pode agir sobre o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), onde evoca dor ao estimular esses canais (ANDERSSON et al., 2013). Contudo, mais estudos ainda são necessários para elucidar os mecanismos de ação pelos quais o MGO pode exercer esses efeitos.

Embora alguns experimentos *in vitro* tenham mostrado que o MGO, como uma molécula endógena ativa, possa influenciar a proliferação e diferenciação celular, mobilização de vesículas e até a regulação do crescimento celular, sabe-se que ele é uma substância tóxica (KALAPOUS, 1994; ALLAMAN et al., 2015). Diabetes mellitus ou diabetes, é um transtorno metabólico caracterizada por hiperglicemia (ZACCARDI et al., 2016). Níveis elevados de MGO foram encontrados no plasma e nos tecidos de pessoas com diabetes, os quais acredita-se que sejam decorrentes da hiperglicemia (THORNALLEY, 1993; MCLELLAN et al., 1994;

KONG et al., 2014). Além disso, os níveis de MGO foram encontrados significativamente maiores no plasma de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, quando comparados a animais controle. Interessantemente, os animais afetados apresentaram déficits de memória (HUANG et al., 2012).

A glicação aberrante é uma consequência do estresse dicarbonílico. A glicação é uma série complexa de reações sequenciais e paralelas, nas quais aldeídos reativos, como o MGO, modificam grupos amino. Estas reações são coletivamente chamadas de reação de Maillard (THORNALLEY, 2005). O MGO induz modificações de fosfolipídios básicos, proteínas e nucleotídeos, levando à formação dos chamados produtos finais de glicação avançada (AGEs - do inglês “*advanced glycation end products*”), espécies reativas de oxigênio (ERO) e apoptose (BROWNLEE, 2001; THORNALLEY, 2003; LOH et al., 2006; THORNALLEY & RABBANI, 2011). O MGO é o agente de glicação mais relevante e reativo *in vivo*. Considerando os açúcares redutores, o MGO tem uma capacidade 20000 vezes maior do que a própria glicose em reagir com cadeias laterais de aminoácidos de proteínas, levando à formação de AGEs (THORNALLEY, 2005). Os AGEs formados pelo MGO acabam levando a disfunções das proteínas afetadas (BROWNLEE, 2001). O MGO pode se ligar e modificar os resíduos de arginina, lisina e cisteína de proteínas, e dessa forma, é capaz de inibir um grande número de enzimas, além de promover ligações cruzadas entre proteínas (LO et al., 1994; THORNALLEY, 1996; 2005; THORNALLEY & RABBANI, 2011). Especialmente em relação ao ácido desoxirribonucleico (DNA), o MGO reage com a desoxiguanosina e forma derivados de imidazopurinona. O MGO pode formar dois adutos relativamente estáveis: N2-(1- carboxietil)-desoxiguanosina; e N2-(1, R/S -carboxietil)-desoxiguanosina. Além disso, também foi demonstrado que o MGO pode formar no DNA um aduto chamado MGdG {metilglioxal-3-(2'-desoxiribosil)-6,7-dihidro-6,7-dihidroxi-6/7-metilimidazo-[2,3-b]purina-9(8)um}. O MGdG gerado por MGO foi positivamente associado à frequência de quebras da cadeia de DNA (THORNALLEY et al., 2010).

Existem enzimas capazes de processos de desglicação que podem agir nas fases iniciais da formação dos AGEs, interrompendo a cascada da reação de Maillard, que leva à formação de diferentes produtos. No entanto, nenhuma atividade de desglicação enzimática do MGO foi descrita contra a glicação de proteínas. De forma geral, isso significa que o processo de glicação do MGO é essencialmente irreversível. Isso faz com que as células gastem recursos, tanto para a reciclagem quanto para a síntese de novas proteínas funcionais. Esta é uma saída viável ao contexto de danos irreversíveis decorrentes da formação de AGEs, entretanto, favorece a agregação e o acúmulo de proteínas disfuncionais (SOUSA SILVA et al., 2013).

1.2.2. Efeitos secundários da glicação e suas implicações patológicas

Os AGEs podem se ligar a diferentes receptores celulares, como os receptores de macrófagos dos tipos I e II, o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), oligossacaril transferase-48 (AGE-R1), fosfoproteína 80K-H (AGE-R2) e galectina-3 (AGE-R3). Esses receptores são expressos em uma ampla gama de células, tais como musculares, monócitos, macrófagos, endoteliais, podócitos e células do SNC. Diferentes quadros patológicos podem alterar a expressão desses receptores. Por exemplo, a expressão de RAGE é aumentada nos vasos sanguíneos e rins de pacientes diabéticos, em comparação com pessoas saudáveis (SINGH et al., 2001; PALANISSAMI & PAUL, 2018).

A glicação por MGO afeta principalmente o resíduo de arginina das proteínas e resulta em uma perda de carga positiva levando imediatamente à formação de hidroimidazolonas, como os adutos MG-H1, MG-H2 e MG-H3 (THORNALLEY, 2008; XUE et al., 2014). Pelo menos um aduto de hidroimidazolona está presente em 3 a 13% das proteínas encontradas no corpo humano (AHMED et al., 2005b). Entre os AGEs derivados de modificação da arginina, acredita-se que as hidroimidazolonas sejam as mais prevalentes em humanos (THORNALLEY et al., 2003). Não apenas fatores fisiológicos internos promovem a sua formação, porém o balanço dos níveis desses adutos podem sofrer influências ambientais, uma vez que resíduos de arginina modificadas por glicação compreendem 1,3% do peso de proteína total encontrado em alimentos cozidos (WALTER et al., 1994). No entanto, uma vez que em geral a biodisponibilidade oral de AGEs em alimentos é considerada baixa (mais ou menos 10%), somado ao fato de que suas ligações proteicas cruzadas os tornam resistentes à hidrólise enzimática ou química pelo trato gastrointestinal, acredita-se que a sua formação endógena seja a principal fonte de AGEs (KOSCHINSKY et al., 1997; SINGH et al., 2001).

Os adutos de hidroimidazolonas formados pelo MGO são ligantes fisiológicos do RAGE (XUE et al., 2014). Em geral, os AGEs podem se ligar ao RAGE, desencadeando efeitos deletérios subsequentes como a produção de ERO (SCHLEICHER & FRIESS, 2007). O RAGE é um receptor pertencente à superfamília da imunoglobulina. Diferentes isoformas solúveis do RAGE podem ser geradas por processamento alternativo na sua expressão gênica ou por clivagem proteolítica. Porém, classicamente é um receptor de superfície celular, consistindo de três domínios extracelulares (V, C1 e C2) uma hélice transmembrana e uma cauda citoplasmática curta (NEEPER et al., 1992; PALANISSAMI & PAUL, 2018). O domínio V extracelular pode se ligar a vários ligantes, incluindo AGEs, calgranulinas S100, proteína HMGB1 (do inglês, *High Mobility Group Box 1*) e peptídeo beta-amilóide (A β), a partir do qual

o domínio citoplasmático curto é necessário para mediar a sinalização intracelular. As vias de sinalização intracelular do RAGE são múltiplas envolvendo uma variedade de proteínas. Basicamente, a especificidade das vias ativadas por RAGE é dependente do tipo celular (KAY et al., 2016; CAI et al., 2016; PALANISSAMI & PAUL, 2018; SORCI et al., 2013).

A expressão de RAGE ocorre na superfície de astrócitos, neurônios e microglia e parece ser muito importante na regulação de respostas inflamatórias e imunes no SNC (GONZALEZ-REYES & RUBIANO, 2018). Os AGEs formados no espaço extracelular podem ativar o RAGE desencadeando uma cascata de sinalização intracelular. A sua ativação desencadeia a geração de ERO via NADPH oxidase e também a ativação do fator de transcrição: fator nuclear kappa B (NFκB). Esse efeito gera um aumento da expressão de genes inflamatórios e a formação e liberação de citocinas pró-inflamatórias e ERO, assim como, o aumento da expressão do próprio RAGE, amplificando dessa forma a sua resposta (HOFMANN et al., 1999; KAY et al., 2016; SORCI et al., 2013). Isso pode levar a respostas inflamatórias crônicas, através de um processo persistente de ativação celular mediada por RAGE. Dessa forma, os tecidos podem aumentar a expressão de moléculas de adesão, bem como, aumento da diapedese e comprometimento da integridade da BHE. Portanto, foi proposto que a ativação do RAGE é amplamente responsável pela patogenicidade associada aos AGEs (HOFMANN et al., 1999; SCHLEICHER & FRIESS, 2007; PALANISSAMI & PAUL, 2018).

Na doença de Alzheimer, o RAGE foi implicado nos processos de produção e acumulação de Aβ e emaranhados neurofibrilares, importantes na patogenicidade da doença. Devido a isto, foi postulado que o RAGE esteja envolvido na falha da transmissão sináptica e degeneração neuronal. O RAGE também pode atuar como um importante transportador, regulando o fluxo de Aβ sistêmica circulante para dentro do encéfalo via BHE. Por outro lado, o RAGE solúvel circulante poderia neutralizar a neurotoxicidade da Aβ por promover a sua depuração através da ligação ao domínio V. Além disto, foi proposto que o RAGE celular poderia aumentar a atividade das enzimas β- e γ-secretases, elevando assim a formação de Aβ. Isto aumentaria o influxo de Aβ para o encéfalo, causando prejuízos cognitivos. Dessa forma, estudos pré-clínicos e clínicos têm apontado que drogas capazes de inibir o RAGE podem ser úteis como ferramenta terapêutica na doença de Alzheimer (DEANE et al., 2012; CAI et al., 2016; HONG et al., 2016).

Uma dessas drogas sintetizadas recentemente é o FPS-ZM1 (ZM1; C₂₀H₂₂ClNO), um antagonista de alta afinidade que se liga ao domínio V do RAGE (DEANE et al., 2012) (Figs. 3 e 4). Em roedores, o ZM1 foi capaz de inibir o influxo, mediado por RAGE, de Aβ da circulação para o SNC. Além disso, inibiu a atividade da β-secretase de maneira a diminuir a

produção de A β e suprimir a ativação da microglia e respostas inflamatórias. Não obstante, resultados de diferentes modelos animais têm mostrado que o tratamento com ZM1 é positivo em normalizar o desempenho cognitivo e o comportamento do tipo-depressivo, auxiliar na lesão celular do túbulo renal, diminuir a infiltração celular e edema em modelo de hemorragia encefálica e reduzir o dano oxidativo (DEANE et al., 2012; LI et al., 2015; HONG et al., 2016; LIAN et al., 2017; SANAJOU et al., 2019).

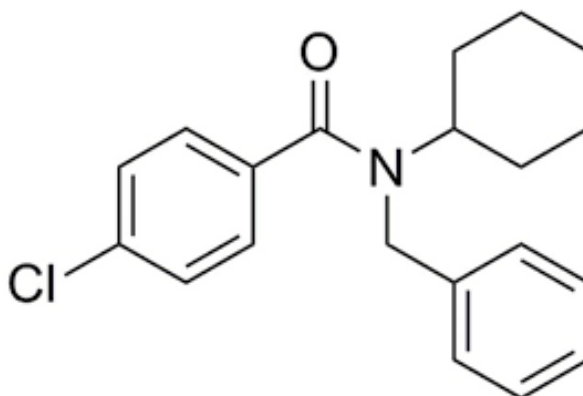


Figura 3. Fórmula estrutural do FPS-ZM1 (C₂₀H₂₂ClNO). (Nome IUPAC: N-benzil-4-cloro-N-ciclohexilbenzamida – 327.8 g/mol) (adaptado de www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019).

Outros efeitos secundários da glicação por MGO, mas de grande relevância, são sobre as enzimas responsáveis por sua própria detoxificação, além de que o tratamento com MGO foi capaz de afetar sistemas antioxidantes celulares. Dafre e colegas (2015) descobriram que, dependendo da concentração, o MGO pode agir tanto de forma benéfica quanto deletéria em relação ao sistema das enzimas glioxalases. Células HT22, derivadas de hipocampo de camundongo, tratadas com MGO em dose não letal, podem induzir fortemente a glioxalase 2 (Glo2), mas em concentrações tóxicas de MGO pode ocorrer a inibição da glioxalase 1 (Glo1) e a diminuição de conteúdo da Glo2 (DAFRE et al., 2015).

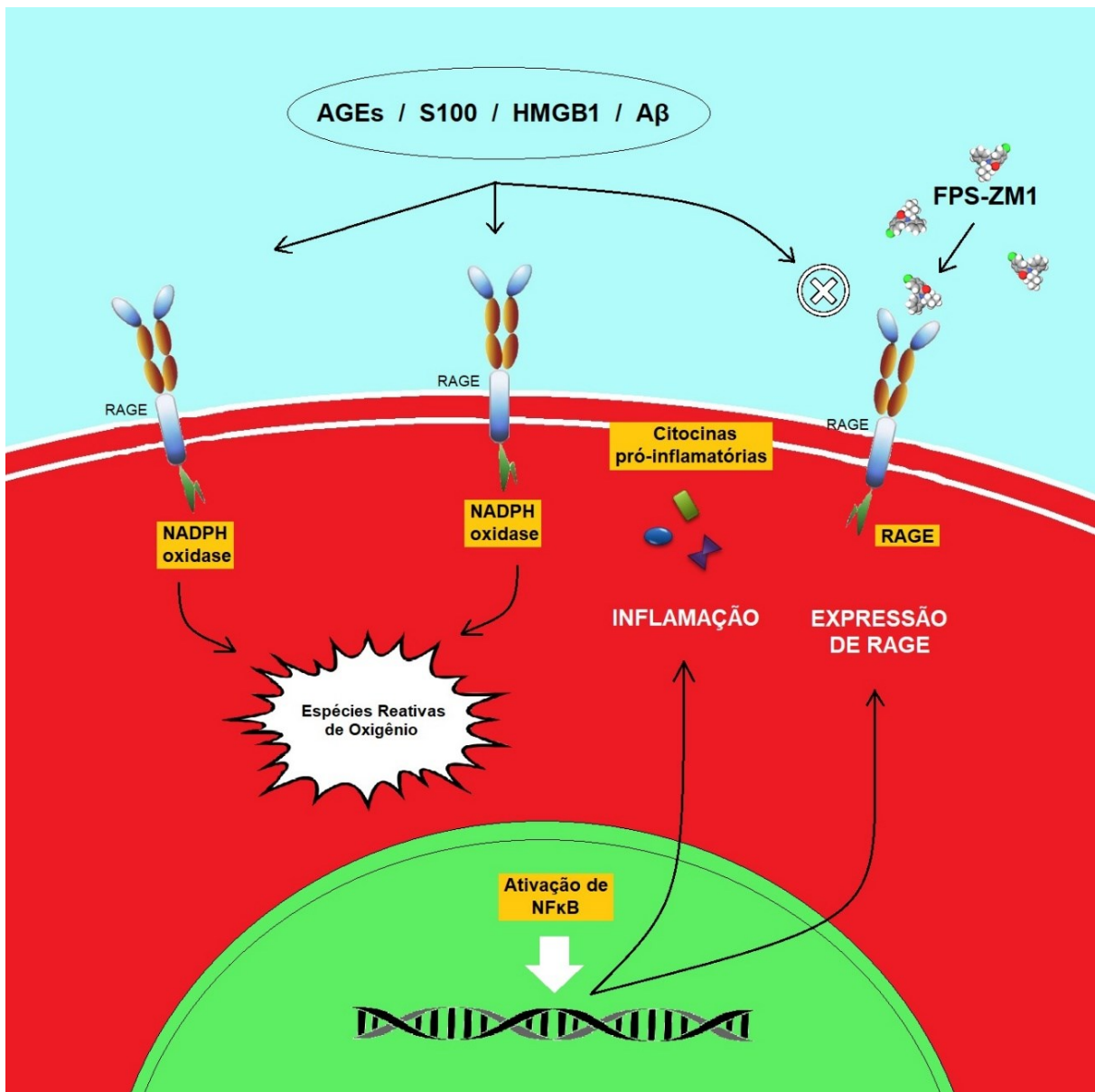


Figura 4. Respostas de ativação ou bloqueio do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) na célula. Os ligantes de ativação incluem: produtos finais de glicação avançada (AGEs), calgranulinas S100, proteína HMGB1 (do inglês, *High Mobility Group Box 1*) e peptídeo beta-amilóide (Aβ); O ligante de bloqueio está representado pelo antagonista FPS-ZM1. A ativação leva à geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) via NADPH oxidase e também a ativação do fator de transcrição: fator nuclear kappa B (NFκB). Isso é seguido por um aumento da expressão de genes inflamatórios e a formação e liberação de citocinas pró-inflamatórias e ERO, assim como, o aumento da expressão de RAGE. (Fonte: do autor).

1.3. Sistemas de detoxificação do metilglioxal

O MGO pode ser detoxificado por enzimas ou vias enzimáticas presentes nas células. Essas enzimas, em geral, são especializadas na metabolização de aldeídos tais como o MGO e o GO (THORNALLEY, 1993). O sistema antioxidante dependente de GSH, composto pelas enzimas glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) e pela própria GSH, representa, juntamente com as moléculas e proteínas associadas ao seu metabolismo, uma das principais linhas de defesa antioxidante celular. A GSH pode neutralizar radicais livres, reduzir peróxidos e reagir espontaneamente com metabólitos endógenos tóxicos como o MGO (SCHAFER & BUETTNER, 2001). Nesse caso, o MGO pode reagir com uma molécula de GSH e formar hemitioacetal. O hemitioacetal, por sua vez, pode ser processado pelo sistema das glioxalases. A integração da GSH com o sistema das glioxalases é considerada a principal via de detoxificação do MGO em mamíferos (SOUSA SILVA et al., 2013).

O sistema das glioxalases, composto pelas enzimas Glo1 e Glo2, é altamente específico e responsável pela detoxificação de moléculas dicarbonílicas, principalmente o MGO. Ele catalisa a conversão de MGO até D-lactato, como produto final. A atividade da Glo1 é o primeiro passo desse sistema. A Glo1 converte o hemitioacetal em S-D-lactoilglutathione, esta por sua vez, é utilizada como substrato para a Glo2 que catalisa a sua hidrólise levando à formação de uma molécula de D-lactato e regenerando a GSH em sua forma reduzida inicial (THORNALLEY, 1993) (Fig. 5).

A sua ligação com GSH impede o MGO de reagir com outras moléculas, o que levaria à prováveis alterações irreversíveis na célula. Após, juntamente com o fim da reação de detoxificação, a mesma molécula de GSH é regenerada no processo sem que haja alteração do *pool* intracelular de GSH (THORNALLEY, 1993; SOUSA SILVA et al., 2013) (Fig. 5). Para fins de importância prática, foi demonstrado que o aumento da expressão de Glo1 reduziu de forma significativa os níveis de AGEs e o estresse oxidativo induzidos pela hiperglicemia em ratos diabéticos (BROUWERS et al., 2011).

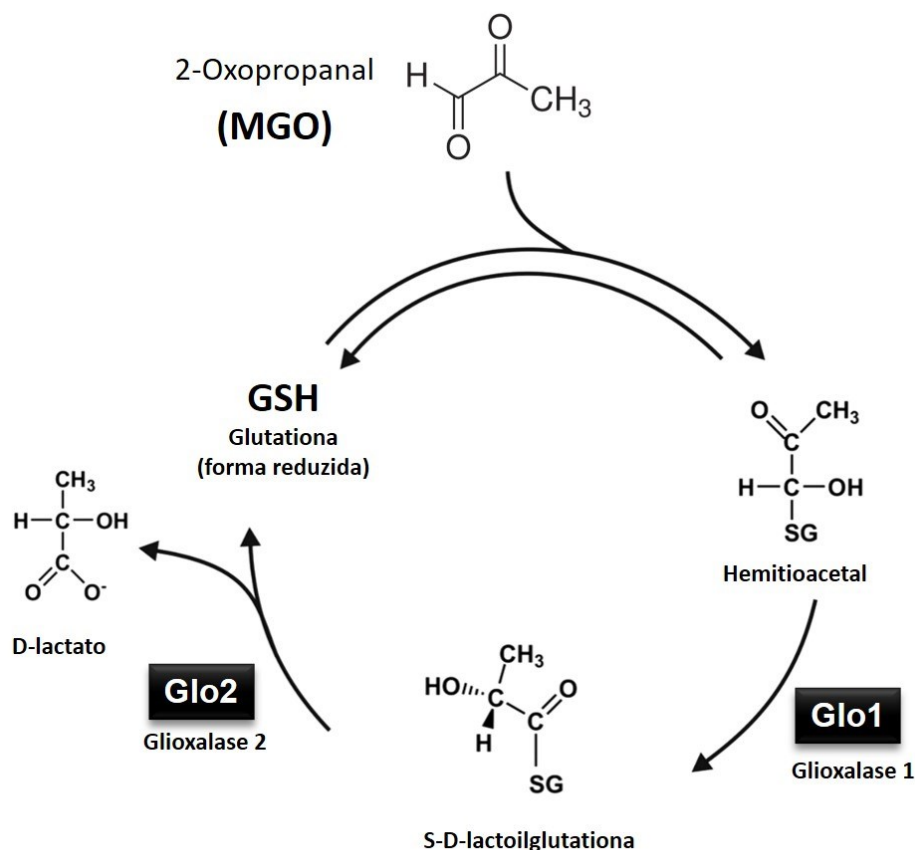


Figura 5. Sistema das glioxalases. Essa via enzimática compreende duas enzimas glioxalases (Glo1 e Glo2) responsáveis pelo catabolismo do metilglioxal (MGO) dependente da glutatona (GSH), formando D-lactato como produto final e regenerando GSH (adaptado de SOUSA SILVA et al., 2013).

A glioxalase 3 (Glo3) catalisa a conversão de MGO em D-lactato de forma irreversível e não requer GSH ou qualquer outro cofator no processo, no entanto, essa enzima foi apenas encontrada em *E. coli* (MISRA et al., 1995). Além disso, ela apresenta uma menor eficiência catalítica quando comparada com a Glo1 (CLUGSTON et al., 1995). A ampla distribuição e presença do sistema das glioxalases nos organismos sugere que é um sistema conservado cuja função é de fundamental importância para a vida (THORNALLEY, 1993; SOUSA SILVA et al., 2013).

Outras enzimas envolvidas na detoxificação do MGO são as aldeído desidrogenases (ADHs) (RABBANI et al., 2016); e enzimas aldo-ceto redutases (AKRs). Dentre as AKRs, pertencentes à superfamília de aldo-ceto redutases, aquelas do grupo Akr1b (com as enzimas Akr1b3, Akr1b7 e Akr1b8) parecem ser particularmente importantes (PRATT-HYATT et al., 2013). Entre as AKRs, a Akr1b3 possui a maior eficiência catalítica para a detoxificação do MGO em camundongos. Foi demonstrado, por exemplo, que células de Schwann deficientes

para a Glo1 foram protegidas pela Akr1b3, especialmente a forma S-Nitrosilada, que utiliza de forma mais eficiente o hemitioacetal como substrato (MORGENSTERN et al., 2017). Outra enzima importante, expressa em todo o corpo, é a DJ-1 com atividade glioxalase. A atividade glioxalase de DJ-1 foi capaz de converter MGO ou GO em ácido lático ou glicólico, respectivamente, sem qualquer cofator (LEE et al., 2012), porém estudos adicionais são necessários pois a sua função já foi contestada (PFAFF et al., 2017a; 2017b; RICHARME, 2017). Além disso, Jang e colaboradores (2017) desenvolveram um camundongo nocaute para a Glo1 e evidenciaram a sua viabilidade. Assim, considerando um maior potencial na formação de MGO no SNC em comparação com outros tecidos, percebe-se que é necessário mais que um único sistema de detoxificação de metabólitos tóxicos no SNC (RABBANI et al., 2016). De acordo com esta ideia, os níveis de RNA mensageiro da Akr1b3 foram encontrados 20 vezes maiores no encéfalo do que em outros tecidos (PRATT-HYATT et al., 2013), indicando sua importância neste tecido.

As enzimas Glo1, AKRs e ADHs estão sob um controle de resposta a estresse através do fator de transcrição Nrf2 (do inglês, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). No citosol o Nrf2 pode se encontrar conjugado a sua proteína reguladora Keap1 (do inglês, *Kelch-like ECH-associated protein 1*). Em eventos de estresse dicarbonílico, moléculas dicarbonilas podem se ligar irreversivelmente a resíduos de cisteína reativos na Keap1, de modo a liberar o Nrf2, o qual pode se translocar para o núcleo e se ligar ao DNA em sequências de resposta antioxidante (ARE – *Antioxidant Response Element*). E dessa forma, o Nrf2 pode promover a transcrição e expressão de GSH, Glo1, AKRs e ADHs (RABBANI & THORNALLEY, 2015).

Estima-se que mais de 99% de todo o MGO endógeno é metabolizado pela Glo1 com ajuda das AKRs, uma vez que em humanos saudáveis, menos de 1% de todo o MGO formado diariamente é capaz de modificar proteínas. Dessa forma, Glo1 e AKRs constituem a maior defesa enzimática contra o MGO. Porém, a eficiência da Glo1 é de longe a maior, uma vez que esta é muito mais distribuída nos tecidos e é bastante abundante (representa 0,02% de todas as proteínas da célula). Esta lógica é diferente apenas na medula renal, onde a expressão de AKRs é mais alta. Além disso, a atividade da Glo1 no metabolismo do MGO, avaliada por estudos *in situ*, excede em mais de 30 vezes a atividade das AKRs (THORNALLEY, 2013; RABBANI et al., 2016). A importância da Glo1 é tamanha, que a sua inibição vem sendo estudada como uma possível estratégia terapêutica para diversas doenças, como epilepsia e a ansiedade (MCMURRAY et al., 2014), câncer (GENG et al., 2014) e depressão (MCMURRAY et al., 2017).

1.4. Aspectos básicos sobre a memória

Memória é o processo biológico de reter e reconstruir conhecimento ao longo do tempo. Esse processo se dá a partir da aprendizagem de novos conhecimentos sobre o meio ambiente (KANDEL et al., 2014). Aprendizagem e memória são essenciais para a sobrevivência dos organismos. Através desses dois processos, comportamentos são produzidos em resposta a mudanças do ambiente. Para mamíferos, a maior parte dos conhecimentos sobre o mundo e a maioria das habilidades não são inatos, mas sim aprendidos. Dessa forma, quem somos, é em grande parte uma consequência do que aprendemos, lembramos e esquecemos (KANDEL et al., 2014; IZQUIERDO, 2002).

As memórias são associativas e dirigidas por estímulos, ou seja, são adquiridas através de processos que fazem a ligação entre um grupo de estímulos com outros (IZQUIERDO et al., 2013). Esses estímulos podem ser neutros ou não. Estímulos aversivos, por exemplo, geram memórias de medo ou aversivas que são formadas via componentes emotivos, a partir do aprendizado de estímulos prévios do ambiente (IZQUIERDO et al., 2016). As memórias podem ser classificadas de diferentes formas, basicamente, de acordo com o seu conteúdo (declarativa ou explícita, processual ou implícita); de acordo com a sua duração (curto prazo, longo prazo); de acordo com a sua natureza de arquivamento (curto prazo, longo prazo); ou do tipo transiente, que é imediata, processada de momento a momento (memória de trabalho) (IZQUIERDO et al., 1999).

O processo de formação da memória inclui diferentes fases: aquisição, consolidação (e reconsolidação), evocação e extinção de informações (IZQUIERDO, 2002). Porém, a memória não é adquirida em sua forma definitiva. Em vez disso, a formação de memória é um processo dinâmico temporariamente graduado, durante o qual novas informações são consolidadas e armazenadas, sofrendo também influências de informações previamente adquiridas. Até mesmo memórias armazenadas a longo prazo podem ser atualizadas com novas associações de informações passando novamente por processos de consolidação chamado de reconsolidação, no qual ela se torna lábil e suscetível à diferentes fatores fisiológicos (MCGAUGH, 2000; BEKINSCHTEIN et al., 2008). Durante esses processos, a memória pode sofrer influência de diversos componentes químicos e eventos estruturais no SNC, que podem ser desencadeados por citocinas, glicocorticoides, monoaminas, entre outros (MCGAUGH, 2000; YIRMIYA & GOSHEN, 2011).

Seguindo o conceito de McGaugh (1968) dos "três sistemas de vestígios da memória", pode-se classificar a memória, enquanto processo, em três entidades: uma memória imediata,

relacionada com a memória de trabalho; uma memória de curto prazo, que se desenvolve em alguns segundos ou minutos e dura no máximo algumas horas; e uma memória de longo prazo, que se consolida devagar e é relativamente permanente (VIANNA et al., 2000). Os três tipos de memória podem ser interconvertidos em detrimento das informações. Estas memórias podem se sobrepor até determinado ponto, dificultando a determinação das fronteiras entre elas. Apesar disso, elas representam categorias de fenômenos distintos, sendo que alterações de uma determinada unidade de informação em um tipo, não necessariamente afeta outro tipo de memória (BEKINSCHTEIN et al., 2008; COWAN, 2008).

1.4.1. Diferenças entre os tipos de memória

Memória de trabalho: A memória de trabalho é entendida como a combinação de múltiplos componentes atuando em conjunto. É usada para planejar e executar o comportamento. É a memória que nos permite evitar de adicionar o mesmo ingrediente duas vezes na hora de fazer um bolo, por exemplo. A memória de trabalho é dependente principalmente da atividade elétrica das células do córtex pré-frontal em ligação com outras regiões encefálicas, tais como a amígdala e via córtex entorrinal com o hipocampo. Esse tipo de memória persiste apenas enquanto a atividade elétrica que a originou persistir, ou seja, é um sistema dependente de atividade persistente ou “*on-line*”. Ao contrário, a memória de curto prazo e a memória de longo prazo são sistemas cujo papel principal é preservar as memórias de forma “*off-line*”, quando estas não estão necessariamente evocadas de forma consciente, o que permite que as informações sejam usadas quando for necessário. A memória de trabalho só pode gerenciar uma quantidade limitada de informações em um dado momento e é manipulada e gerenciada com a ajuda de processos relacionados à atenção. Ela não pode ser considerada completamente distinta da memória de curto prazo, porém, diferente desta, a memória de trabalho não é um arquivo de memórias individuais, mas sim, atua como um gerenciador de eventos cognitivos momento-a-momento, e que pode relacionar as informações recém aprendidas entre si e com as que estão armazenadas de curto ou longo prazo. Nesse sentido, alguns pesquisadores concordam que há uma forte contribuição da memória de longo prazo, o que reduz a carga da memória de trabalho organizando e agrupando informações na memória de trabalho em um número menor de unidades (GOLD & MCGAUGH, 1975; BADDELEY et al., 1975; FUSTER, 1998; COWAN, 2008; IZQUIERDO et al., 2013).

Memória de curto prazo: As diferenças mais marcantes entre as memórias de curto e longo prazo são a duração e a capacidade. Em relação à duração, significa que as informações armazenadas na memória de curto prazo se deterioram em função do tempo, ou seja, elas se originam com tempo de formação acima de segundos, mas perduram no máximo até 0,5-6 horas. Quanto à capacidade, significa que existe um limite de quantas unidades de informação podem ser armazenadas. Assim, várias unidades menores que o limite de capacidade podem permanecer armazenadas até serem substituídas por outras unidades. Representações estáveis formadas pela memória de trabalho podem ser consolidadas em memória de curto prazo. Esse processo ocorre ao mesmo tempo que se inicia, através de mecanismos diferentes, o processo de consolidação dessas informações na memória de longa duração, permitindo dessa forma, uma existência mais duradoura e até permanente dessas informações (COWAN, 2008; IZQUIERDO et al., 2013).

Memória de longo prazo: Diferentemente da memória de curto prazo que se utiliza de processos bioquímicos breves no hipocampo e córtex entorrinal, a formação da memória de longo prazo requer uma sequência de passos moleculares que envolve a síntese de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) e proteínas. Esse processo dura no mínimo de 3 a 6 horas, no hipocampo, nos núcleos amigdalinos, e em outras regiões, mas pode perdurar por períodos mais longos que vão de várias horas até dias ou semanas. Durante esse processo a sua formação é suscetível a numerosas influências fisiológicas e pode ser afetada por diversas substâncias de origem exógena, como fármacos e toxinas. A formação da memória de longo prazo pode refletir em grandes e duradouras alterações da plasticidade sináptica, sendo esta, a provável responsável por armazenar a memória, que neste caso, pode perdurar por muitas horas, dias ou até anos (IZQUIERDO et al., 2013; IZQUIERDO & MEDINA, 1991; BEKINSCHTEIN et al., 2008).

1.4.2. Estruturas e mecanismos de memória

O hipocampo é uma estrutura encefálica essencial tanto para a codificação de memórias espaciais e episódicas (RYAN et al., 2010), quanto para a detecção de novidades (JENKINS et al., 2004). Ele é composto pelas regiões do *cornu ammonis* (CA) com CA1, CA2 e CA3 e é parte integrante da formação hipocampal. Além do hipocampo, a formação hipocampal é composta por diferentes estruturas neuroanatômicas: o giro denteado (DG), córtex entorrinal (LEC), subículo, presubículo e parasubículo que podem refletir diferentes funções e participam dos processos da formação da memória (Fig. 6) (HARTLEY et al., 2013).

Além de um mapeamento do contexto espacial através de “células de lugar”, neurônios do hipocampo mapeiam a organização temporal de experiências em conjuntos de "células de tempo" que disparam em momentos sequenciais em episódios ordenados temporalmente (PRESTON & EICHENBAUM, 2013).

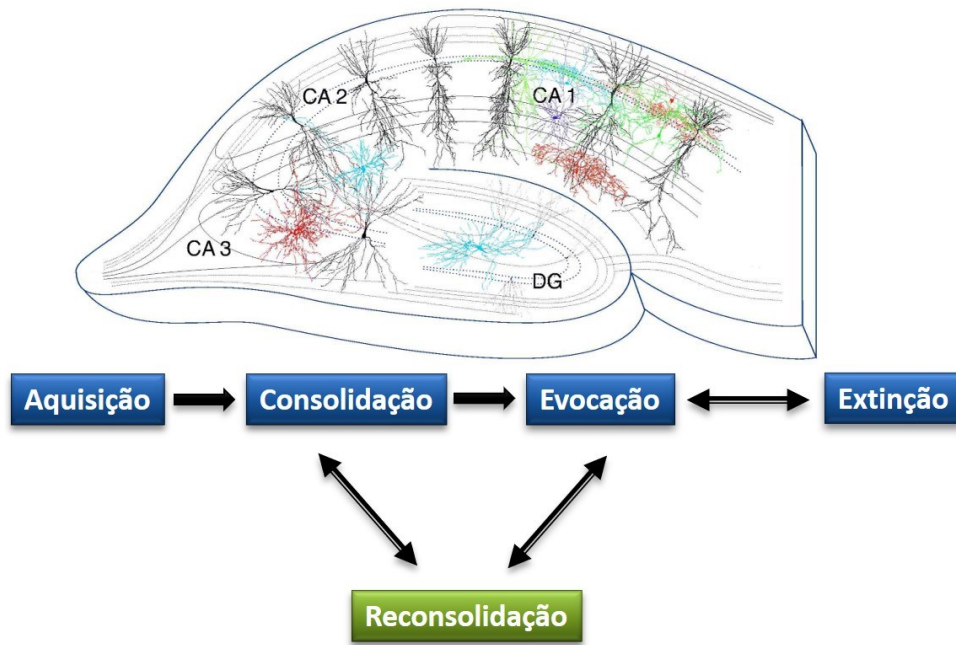


Figura 6. Formação hipocampal e fases da formação da memória. Estão representadas as regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado (DG) (HARTLEY et al., 2013; IZQUIERDO et al., 2013). (Fonte: do autor).

Juntamente com o hipocampo, outras estruturas podem ter participação crucial na formação das memórias. Por exemplo, as células neuronais piramidais da região CA1 do hipocampo recebem entradas sensoriais diretas do córtex (LISMAN & OTMAKHOVA, 2001). O hipocampo integra um circuito bastante estudado, que inclui o LEC, córtex perirrinal (PRC), núcleo da amígdala, além de áreas corticais distantes. A codificação da memória no hipocampo, e por consequência a consolidação, dependem de uma interação dinâmica com áreas corticais. Nesse sentido, o córtex pré-frontal, principalmente a sua região medial, tem um papel crucial na formação e utilização dessas memórias na emissão de comportamentos. Evidências recentes mostram que o córtex pré-frontal adquire representações de contextos comportamentais de forma a orientar a evocação de memórias que determinam a execução de comportamentos apropriados ao contexto. E nesse processo, ele afeta a consolidação e reconsolidação da memória através do hipocampo (IZQUIERDO et al., 2013; PRESTON & EICHENBAUM, 2013).

Um modelo de interações funcionais entre o córtex pré-frontal e o hipocampo inclui a região talâmica do núcleo reuniens (Re). Em contextos de memória episódica, o Re faz comunicação entre o córtex pré-frontal medial (mPFC) e o hipocampo de maneira bidirecional. Por exemplo, quando pistas de contexto são apresentadas a um roedor (fase de aquisição), o Re se envolve em uma sincronia de comunicação que provém do hipocampo para o córtex pré-frontal, de forma a enviar informações contextuais do hipocampo ventral (vHPC) para o mPFC (Fig. 7A). Porém, posteriormente, durante a evocação da memória guiada por contexto, o Re se engaja em sincronia de comunicação direcionada do córtex pré-frontal para o hipocampo, de modo que o mPFC incite a evocação de memórias específicas no hipocampo, quando o hipocampo dorsal (dHPC) recebe informações do mPFC via PRC e LEC (Fig. 7B) (EICHENBAUM, 2017).

Tanto o hipocampo quanto a amígdala e o córtex, recebem também terminações de vias nervosas vinculadas com o afeto, ansiedade, estresse e atenção, o que influencia diferentes estados de consciência no indivíduo. Essas vias são: a dopaminérgica, a noradrenérgica, a serotoninérgica e as colinérgicas, que agem através de receptores específicos para os seus respectivos neurotransmissores (IZQUIERDO et al., 2013). As monoaminas dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT), podem facilitar a consolidação da memória como também o surgimento de novos neurônios (neurogênese), importantes para a retenção e transformação de novas informações (MCGAUGH, 2000; YIRMIYA & GOSHEN, 2011). Essas vias estão envolvidas em vários processos que podem ser alterados em resposta à diferentes estímulos ou substâncias e dessa forma, acabam por modular as memórias de forma direta ou indireta. Por exemplo, DA e NA agem como neurotransmissores relacionados com a vigília e o alerta, e estes por sua vez, podem afetar a sensibilidade à estímulos do ambiente refletindo na diminuição ou aumento da aquisição e integração da memória. Já a acetilcolina, é responsável por regular uma grande variedade de percepções emocionais. Enquanto a 5-HT é muito importante na regulação da motivação, sendo que níveis baixos desse neurotransmissor estão relacionados com o surgimento e permanência de quadros depressivos no homem e que apresentam características relacionadas com déficits de memória (IZQUIERDO et al., 2013).

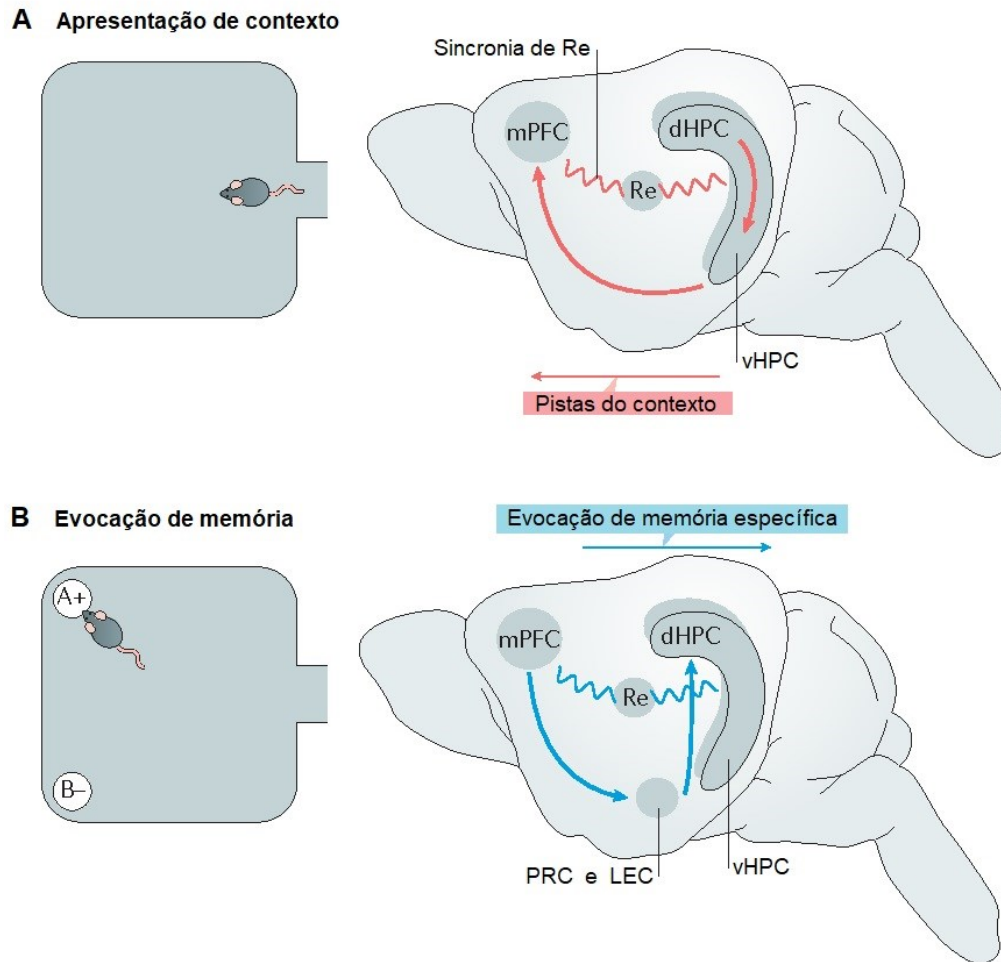


Figura 7. Modelo de interação funcional hipocampo-córtex pré-frontal. Aqui é ilustrado em modelo animal murino de memória guiada por contexto, com A) apresentação de contexto e B) evocação de memória específica dependente de contexto. Estão envolvidos o núcleo reuniens (Re), córtex pré-frontal medial (mPFC), hipocampo dorsal (dHPC), hipocampo ventral (vHPC), córtex perirrinal (PRC) e córtex entorrinal (LEC) (adaptado de EICHENBAUM, 2017).

A eficiência desses neurotransmissores é dependente, tanto dos processos de sua síntese e degradação, quanto da dinâmica do seu transporte e liberação. Várias drogas podem potencializar ou atenuar a ação das monoaminas no SNC ao se ligarem nos seus respectivos transportadores celulares. A bupropiona, por exemplo, é capaz de bloquear os transportadores para DA (DAT) e NA (NET). Dessa forma, a recaptação desses neurotransmissores para o interior das células é reduzida, o que possibilita uma maior interação na fenda sináptica, proporcionando um aumento da neurotransmissão monoaminérgica da DA e NA. Embora a bupropiona seja um fármaco antidepressivo atípico, muito explorado no tratamento de

transtorno depressivo maior (TDM), estudos relatam que dependendo do caso, a bupropiona pode contribuir na restauração de déficits cognitivos. Por exemplo, como quando a memória e o desempenho da velocidade de processamento mental estão comprometidos (FAVA ET AL., 2005; BAUNE & RENGER, 2014; GÓMEZ et al., 2016).

A potenciação de longo prazo (LTP – *Long Term Potentiation*) é uma forma de plasticidade sináptica que parece controlar informações relevantes no hipocampo. Através da LTP, o hipocampo e o córtex codificam as informações sensoriais provenientes do ambiente pelo fortalecimento e facilitação de sinapses específicas. Esse processo, que envolve a participação de diferentes proteínas e etapas, permite a conversão das informações codificadas em memórias de longo prazo. Esta, por sua vez, pode ser evocada pelo animal e de modo a ser utilizada em juízos de julgamento, tomadas de decisão e emissão de comportamentos correspondentes ao seu meio (LISMAN & GRACE, 2005; PRESTON & EICHENBAUM, 2013). Em condições normais, a formação da LTP pode ser extremamente facilitada pelas monoaminas DA, NA e 5-HT levando à formação das memórias (MCGAUGH, 2000; YIRMIYA & GOSHEN, 2011). Além disso, a LTP também é modulada por diferentes componentes endógenos e exógenos, como a cetamina. Embora usada como droga de abuso em alguns casos, a cetamina é também utilizada como anestésico ou no tratamento de diferentes doenças psiquiátricas. Foi demonstrado que a cetamina pode produzir um efeito antidepressivo de início rápido em pacientes depressivos resistente a tratamentos convencionais (MOLERO et al., 2018; PRICE & DUMAN, 2019). Os mecanismos de ação e efeitos da cetamina ainda estão em constante debate, porém sabe-se que causa o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) (MOLERO et al., 2018). Dessa forma, a cetamina pode exercer efeitos diretos sobre a memória, uma vez que a ativação do NMDAR no SNC é essencial para o início da LTP e a formação de memória (JOHNSON et al., 2018). Além disso, em modelos animais de estresse e comportamento tipo-depressivo, a cetamina foi capaz de reverter rapidamente déficits de neuroplasticidade (PRICE & DUMAN, 2019). Dessa forma, a avaliação do comportamento animal sob determinados contextos, pode ser, não apenas uma forma indireta de avaliação, mas também uma evidência da memória. Além disso, a experimentação animal é um meio de verificar a capacidade e a extensão de alterações cognitivas ao nível indivíduo-ambiente, o que em última instância, é relevante em saúde e funcionalidade sociais (KANDEL et al., 2014; IZQUIERDO, 2002).

1.5. O envolvimento do metilgloxal em doenças e a sua investigação através de modelos animais

O avanço da idade é o maior fator preditivo para o declínio cognitivo em humanos (MORRIS, 2009). O comprometimento cognitivo leve (MCI - *Mild Cognitive Impairment*) é caracterizado por diminuições das habilidades cognitivas que aumentam conforme o indivíduo envelhece. Estes prejuízos cognitivos não privam o indivíduo de uma existência independente e considerada funcional. Entretanto, nem todas as formas de MCI evoluem para doenças neurodegenerativas, as quais geram grandes prejuízos cognitivos, causando incapacidade severa, como observado na doença de Alzheimer. Assim, o aumento médio na expectativa de vida da população, destacam a crescente importância do MCI como promotor de incapacidades em humanos (PETERSEN et al., 2014). A maioria dos dados da literatura até o momento, em relação aos efeitos do MGO sobre a memória, não são *in vivo*, mas sim *in vitro*, avaliando, principalmente, a citotoxicidade do MGO sobre o hipocampo (RAMIREZ et al., 2013). Esses estudos geralmente utilizam tratamentos agudos e doses do MGO que extrapolam em muito os níveis fisiológicos, sem estudos sistemáticos de seus efeitos. No entanto, foi demonstrado que o MGO provoca um forte enfraquecimento da capacidade de detoxificação e morte celular apoptótica nos neurônios do hipocampo de ratos (DI LORETO et al., 2008). E mais recentemente, descobriu-se que o MGO pode causar a morte celular de células progenitoras neurais e impede a neurogênese no hipocampo adulto (CHUN et al., 2016).

Estudos clínicos recentes revelaram que níveis elevados de MGO plasmático, e proteínas modificadas pelo mesmo, foram associados ao declínio cognitivo mais acelerado (BEERI et al., 2011; WEST et al., 2014). Um outro estudo, conduzido por Srikanth e colegas (2013), avaliando uma amostra com 378 pessoas idosas, investigaram o papel do MGO no declínio cognitivo e neurodegeneração. Nesse estudo, encontrou-se que níveis elevados de MGO estavam associados com uma diminuição da memória, menor função executiva, e atrofia encefálica, caracterizada por um menor volume de matéria cinzenta dos idosos (SRIKANTH et al., 2013). Esses trabalhos têm grande relevância, pois fornecem evidências da provável ligação entre o MGO e declínio cognitivo e neurodegeneração em humanos.

A doença de Alzheimer é o distúrbio neurodegenerativo mais prevalente e letal. O acúmulo neurotóxico do peptídeo A β formando agregados proteicos é considerado responsável pela patologia da doença que é caracterizada por neuroinflamação e também por prejuízos cognitivos (WOODBERRY et al., 2015; MURONETZ et al., 2017). Na doença de Alzheimer há o aumento intracelular na concentração de compostos carbonílicos reativos (MGO e

gliceraldeído 3-fosfato) como resultado do acúmulo de trioses fosfato por disfunção do metabolismo da glicose. Essa disfunção é causada, por exemplo, pela inibição da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (MURONETZ et al., 2017). Um estudo *in vitro* também demonstrou que o MGO é capaz de causar a glicação do peptídeo A β , e assim, gerar formas oligoméricas maiores contendo folhas- β (LI et al., 2013). Além disso, em outro estudo, verificou-se que a formação de AGEs acelera a transição do peptídeo β -amilóide monomérico para sua forma oligomérica e, em seguida, gerando agregados ainda maiores (TAGHAVI, et al., 2017). Esses estudos indicam que o MGO pode atuar na progressão ou desenvolvimento de doenças neurodegenerativas ou demências.

A participação do MGO em outras doenças também foi investigada. Diferentes estudos utilizando roedores sugerem que os níveis de MGO no SNC estão negativamente correlacionados com a ansiedade, seja por diferenças genéticas na expressão de Glo1 ou por modulação de sua atividade e expressão (KRÖMER et al., 2005; DISTLER & PALMER, 2012b). Primeiramente, maiores níveis de Glo1 no encéfalo foram associados ao comportamento do tipo ansioso em camundongos, enquanto que menores níveis de Glo1 diminuíram o perfil de ansiedade (HOVATTA et al., 2005). Posteriormente, o papel causal dos níveis de MGO em modular o comportamento tipo-ansioso nos animais foi demonstrado, bem como evidências para o envolvimento do sistema GABAérgico nos efeitos ansiolíticos do MGO (HAMBSCHE et al., 2010; HAMBSCHE, 2011; DISTLER et al., 2012a; DISTLER & PALMER, 2012b; DISTLER et al., 2013; MCMURRAY et al., 2016). Além disso, a inibição genética e também farmacológica de Glo1 em modelos de estresse crônico com camundongos, produziu efeitos antidepressivos. Isso sugeriu que inibidores da Glo1 poderiam ser utilizados como fármacos de ação rápida para o tratamento do TDM (MCMURRAY et al., 2014; 2017). Nesse sentido, o TDM é caracterizado por prejuízos cognitivos, tanto em humanos, como através de modelos animais (BAUNE & RENGGER, 2014; PRICE & DUMAN, 2019).

O transtorno do espectro autista (TEA) já foi anteriormente associado com altos níveis de MGO e AGEs em humanos (JUNAID et al., 2004). O TEA representa um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por dificuldades na interação social e comunicação, tanto verbal quanto não verbal, e por comportamentos restritos e repetitivos (CRIPPA et al., 2016). Recentemente, também foi encontrado uma fraca associação entre variantes genéticas da Glo1 e o TEA (KOVÁČ et al., 2015). No entanto, os mecanismos subjacentes ao envolvimento do MGO e Glo1 no TEA permanecem desconhecidos.

Em um outro estudo, explorando um modelo animal de epilepsia, camundongos foram tratados com MGO antes da indução de crises epilépticas por picrotoxina e pilocarpina.

Observou-se que o MGO atenuou as crises epilépticas e que a inibição da Glo1 nos animais apresentou o mesmo efeito. Além disso, camundongos transgênicos sobreexpressando Glo1 apresentaram níveis reduzidos de MGO no encéfalo, e também maior severidade de crises epilépticas (DISTLER et al., 2013). Esse estudo, traz à tona a possibilidade de que o aumento nos níveis de MGO pode ser uma estratégia terapêutica para a epilepsia.

Outros estudos avaliaram os efeitos de níveis alterados de MGO usando modelos animais e encontraram comprometimento cognitivo. Em um estudo conduzido por Huang e outros (2012), observou-se que ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, além de níveis aumentados de MGO, em comparação com o grupo controle, apresentaram: a) uma latência de escape significativamente maior; b) um tempo de natação médio mais curto no quadrante alvo e c) uma distância média mais longa percorrida até alcançar a plataforma no labirinto aquático de Morris. Esses resultados denotam que os ratos diabéticos apresentaram comprometimento da memória espacial (HUANG et al., 2012). Em outro estudo investigando os efeitos do MGO sobre a disfunção renal e a memória, ratos Sprague-Dawley foram tratados por 12 meses com 0,5% de MGO na água de beber. Então, os animais foram submetidos ao teste de exploração de objetos e ao teste do labirinto radial pelos quais se avaliou a memória espacial referencial e a memória de trabalho, respectivamente. Os animais tratados com MGO apresentaram níveis significativamente elevados de MGO no soro, no entanto, os grupos não diferiram em termos de função cognitiva durante e ao final do tratamento. Assim, os autores concluíram que o tratamento prolongado com MGO em ratos não causou comprometimento cognitivo (WATANABE et al., 2014). Outro estudo tratou camundongos com 0,5 ou 1% de MGO na água de beber por 4 semanas e os submeteu ao teste de esquiva passiva. Observou-se que os animais apresentaram diminuição da memória aversiva quando tratados com 1%, mas não quando tratados com 0,5% de MGO (CHUN et al., 2016). Indicando assim, que talvez a dose ou o tempo de tratamento sejam fatores cruciais nos efeitos do MGO. A injeção intracerebroventricular (i. c. v.) de MGO também foi testada em animais. Injeções repetidas de MGO (3 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) foram aplicadas em ratos por 6 dias e após 3 semanas da interrupção do tratamento, os animais foram submetidos a um teste de reconhecimento de objeto. Foi observado um comprometimento da memória de reconhecimento de curto prazo. Porém, ao se avaliar a memória de trabalho em teste de alternância espontânea no labirinto em Y, não foram encontrados comprometimentos da memória de trabalho (HANSEN et al., 2016). Esses estudos indicam que o MGO pode desempenhar um papel crucial na progressão ou desenvolvimento de comprometimentos cognitivos, porém não está claro a sua relevância e como seus efeitos ocorrem *in vivo*.

2. JUSTIFICATIVA

A expectativa de vida do homem vem aumentando em escala global, e atualmente a prevalência de comprometimento cognitivo tem aumentado com o avanço da idade dos indivíduos em praticamente todos os países (MORRIS, 2009). Além disso, está previsto que o número de casos de demência deve dobrar a cada 20 anos, atingindo mais de 80 milhões de pessoas ao ano de 2040 (FERRI et al., 2005). Dessa forma, é essencial que a qualidade de vida, e a compreensão dos mecanismos biológicos que a geram, também acompanhem a escala desse crescimento (MORRIS, 2009; PETERSEN et al., 2014). O MGO tem sido considerado um possível agente causador de uma série de patologias, tais como hiperalgesia e inflamação (KOIVISTO et al., 2014), diabetes (MATAFOME et al., 2013; TIAN et al.; 2014), ansiedade e depressão (DISTLER & PALMER, 2012b), epilepsia (DISTLER et al., 2013), distúrbios relacionados ao envelhecimento (DESAI et al., 2010) e doença de Alzheimer (ANGELONI et al., 2014).

Déficits nas funções nervosas e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, têm sido associados a radicais livres, além de outras moléculas danosas (DASURI et al., 2013). Aumento de danos a proteínas, causados por glicação, tem sido correlacionado com a morte neuronal, o que poderia contribuir com a progressão da doença de Alzheimer. O acúmulo de AGEs no encéfalo de pacientes com doença de Alzheimer foi associado com a formação de depósitos insolúveis, como placas amilóides e emaranhados neurofibrilares (MURONETZ et al., 2017). Além disso, tanto processos de glicação, quanto a formação de AGEs no líquido cefalorraquidiano de pacientes com doença de Alzheimer, foram associados a prejuízos cognitivos (AHMED et al., 2005). Estudos com populações humanas revelam associações positivas entre MGO e prejuízos cognitivos (BEERI et al., 2011; SRIKANTH et al., 2013; WEST et al., 2014).

A diabetes é a doença endócrina mais comum e atualmente afeta globalmente mais de 422 milhões de pessoas, sendo que é previsto aumento de sua prevalência no futuro (NCD-RISC, 2016; SHAW et al., 2010). Além disso, a diabetes apresenta várias complicações subjacentes, como nefropatia, obesidade, inflamação, entre outras, incluindo neuropatia e disfunção cognitiva (FORBES & COOPER, 2013; DE LA MONTE, 2014). Déficits na aprendizagem e memória, bem como um maior risco de declínio cognitivo e doença de Alzheimer, estão fortemente associados à diabetes (KODL & SEAQUIST, 2008; KOPF &

FROLICH, 2009; DASH, 2013). Assim, além de níveis plasmáticos aumentados de MGO na diabetes (THORNALLEY, 1993; KONG et al., 2014), há o crescente reconhecimento de que a função cognitiva também diminui em pacientes portadores desta doença, portanto, levantando a questão da possível ligação entre os dois fenômenos.

Contudo, ainda não está claro se o MGO é o fator causal direto dos prejuízos cognitivos nas diferentes patologias, nem quais são os mecanismos de ação através dos quais o MGO modula a aprendizagem e memória, e as alterações comportamentais decorrentes. O conjunto de evidências é ainda inconclusivo e está em constante debate (WATANABE et al., 2014). Assim, o papel patogênico do MGO para os diferentes distúrbios aos quais tem sido associado, sobretudo quanto ao comprometimento cognitivo, ainda requer investigação.

Considerando estas justificativas, foi elaborado um protocolo para investigar os efeitos da injeção sistêmica de diferentes doses de MGO em camundongos fêmeas de 3 meses de idade, tanto após uma única injeção, quanto em doses repetidas de até 11 dias. Foram empregados diferentes modelos animais de função motora, dor, ansiedade, depressão, cognição e múltiplos parâmetros comportamentais e bioquímicos foram avaliados nos animais. Após o protocolo de tratamento repetido, os níveis proteicos e atividade do sistema das glioxalases, os níveis de diferentes monoaminas e indicadores de estresse oxidativo foram avaliados no córtex pré-frontal e no hipocampo. Os níveis plasmáticos de MGO nos animais também foram avaliados. Em uma segunda abordagem, a participação do MGO foi investigada em relação a diferentes sistemas neuroquímicos e sistêmicos. Para tanto, foi empregado, de forma concomitante ao tratamento com MGO, outros fármacos e substâncias já conhecidas, tais como bupropiona, cetamina, muscimol, bicuculina e um antagonista do RAGE (ZM1), que foi recentemente desenvolvido.

3. HIPÓTESE

Com base nas informações explanadas acima, hipotetiza-se aqui que o MGO está associado a alterações deletérias *in vivo*, tanto a nível bioquímico quanto comportamental. A presença de tais alterações e suas severidades em mamíferos, no entanto, são intimamente dependentes de respostas fisiológicas a fatores dinâmicos da substância, como nível relativo ou regime de exposição.

Assim, conclui-se que intervenções farmacológicas, que potencialmente interrompam cadeias de sinalização intracelular ativadas pelo MGO ou direta ou indiretamente produzam efeitos compensatórios sobre possíveis alterações neuroquímicas deletérias causadas pelo mesmo, podem refletir no impedimento de prejuízos cognitivos, detectados comportamentalmente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar, em camundongo, os efeitos do metilglioxal sobre o sistema nervoso em relação aos seus mecanismos de ação e à sua detoxificação, tanto por abordagens comportamentais, como bioquímicas.

4.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar os efeitos comportamentais do metilglioxal após tratamento agudo (20, 80, 200 mg/kg, intraperitoneal - i. p.), sobre:
 - Atividade locomotora espontânea: teste do campo aberto;
 - Coordenação motora: teste do poste;
 - Comportamento tipo-ansioso: teste do campo aberto;
 - Memória espacial: teste de realocação de objeto;
 - Comportamentos estereotipados: avaliação de *grooming* e *rearing*;

- II. Investigar os efeitos comportamentais do tratamento repetido com MGO nas doses de 10, 25, 50 mg/kg, i. p., dose única diária, ao longo de até 11 dias, sobre:
 - Atividade locomotora espontânea: teste do campo aberto;
 - Coordenação motora: teste do poste;
 - Força: teste de barras horizontais;
 - Comportamento tipo-depressivo: teste de suspensão pela cauda;
 - Aprendizagem: habituação em campo aberto;
 - Interação social: teste de interação social;
 - Memória de trabalho: teste de alternância espontânea;
 - Memória espacial: teste de realocação de objeto;

- Memória de reconhecimento: teste de reconhecimento de objeto;
- Memória aversiva: teste de esquiiva inibitória do tipo *step-down*;

III. Investigar os efeitos no hipocampo, córtex pré-frontal e plasma após tratamento repetido de 11 dias com MGO nas doses de 10, 25, 50 mg/kg, i. p., dose única diária, sobre parâmetros bioquímicos:

- Conteúdo de proteínas do sistema das glioxalases: glioxalase 1 e glioxalase 2 por western blotting;
- Atividade de detoxificação do MGO: atividade enzimática da glioxalase 1;
- Níveis de monoaminas: noradrenalina, dopamina e serotonina através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Danos oxidativos celulares: peroxidação lipídica através da quantificação dos níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA) por dot blotting;
- Níveis de MGO no plasma de camundongos através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);

IV. Investigar os efeitos comportamentais de várias drogas sobre as ações do MGO (atividade locomotora espontânea; memórias de trabalho, espacial e aversiva), a partir de dose selecionada (50 mg/kg, i. p.) ao longo de 11 dias de cotratamento com:

- Bupropiona (10 mg/kg, v. o.), inibidor da recaptação de dopamina (DA) e noradrenalina (NA);
- Cetamina (1 mg/kg, i. p.), antagonista de receptores do tipo N-metil-D aspartato (NMDAR);
- Muscimol (0,5 mg/kg, i. p.), agonista de receptores do ácido γ -aminobutírico do tipo A (GABA_AR);
- Bicuculina (2 mg/kg, i. p.), antagonista de GABA_AR;
- FPS-ZM1 (2 mg/kg, i. p.), antagonista de receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Os experimentos foram realizados usando camundongos swiss, fêmeas (35-60 g), de 3 meses de idade, das colônias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Florianópolis, Brasil. Utilizou-se camundongos jovens, de forma a evitar que idades mais avançadas fossem prejudiciais sobre os grupos controle, no que tange a adequada execução dos experimentos e de modo a não sobrepor os efeitos dos tratamentos. A escolha do sexo foi devida a frequente comorbidade entre prejuízos cognitivos e distúrbios psiquiátricos (BIESSELS et al., 2006; BORA et al., 2017). Nesse sentido, distúrbios psiquiátricos, como a depressão, são duas vezes mais prevalentes em mulheres do que em homens (WONG & LICINIO, 2001). Além disso, há uma prevalência maior de MCI não-amnésico entre as mulheres (AU et al., 2017).

Os animais foram mantidos em grupos de 10-12 animais por gaiola (42 x 34 x 17 cm), alojados em condições controladas de temperatura (23 ± 1 °C), sob ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas), com livre acesso a água e comida (ração padrão).

5.2. Tratamentos

As soluções foram administradas uma vez por dia, para cada substância, em mg/kg de peso corporal relativo a cada animal. A via de administração foi através de injeção intraperitoneal (i. p.) com volume de injeção relativo de 1 ml/100 g de peso corporal. Exceções foram feitas para a administração de bupropiona, que foi realizada por via oral (v. o.) através de gavagem, para os grupos controle e tratado.

Os animais foram tratados com solução salina 0,9% (veículo: controle); o MGO foi tratado diluído em veículo, em diferentes doses por grupo (10, 20, 25, 50, 80 ou 200 mg/kg, i. p.) da solução metilglioal ($C_3H_4O_2$, molar: 72,06 g/mol) (Sigma-Aldrich, Co.; CAS Number: 78-98-8). Outros fármacos e substâncias também foram tratados diluídos em veículo, de forma única ou em cotratamento com MGO: bupropiona (10 mg/kg) (Zetron®: cloridrato de bupropiona (150 mg), Libbs Farmacêutica Ltda.); cetamina (1 mg/kg) (Cetamin®: cloridrato de cetamina (10%), Syntec Farmacêutica Ltda.); muscimol (0,5 mg/kg) ($C_4H_6N_2O_2$, massa

molar: 114,10 g/mol) (Sigma-Aldrich, Co.; CAS Number: 2763-96-4); bicuculina (2 mg/kg) ($C_{20}H_{17}NO_6$, massa molar: 367,35 g/mol) (Bicuculline: Sigma-Aldrich, Co.; CAS Number: 485-49-4); FPS-ZM1 (2 mg/kg) ($C_{20}H_{22}ClNO$, massa molar: 327,85 g/mol) (FPS ZM1 - 6237 - (50 mg): Tocris Bioscience, Co.; CAS Number: 945714-67-0). Quando em cotratamento, os grupos controle, MGO e ZM1 também receberam mais uma administração diária, porém, de salina e em via de administração respectiva, para que o estresse animal fosse similar entre os grupos. O tratamento dos grupos controle acompanhou os tratamentos para cada droga no mesmo período. As doses e os limites de doses utilizados para as diferentes substâncias acima, foram selecionados com base em sua segurança e eficácia em modelos animais observados em estudos anteriores (GHOSH et al., 2006; GÓMEZ et al., 2016; CUNHA et al., 2015; YOON et al., 2002; MEDIRATTA et al., 2013; DEANE et al., 2012).

5.3. Desenho experimental

Para avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos do MGO, os camundongos foram tratados utilizando duas abordagens de administração, com grupos independentes de animais: administrações agudas únicas (doses de 20, 80, 200 mg/kg – protocolo agudo) seguido de testes comportamentais; e tratamentos repetidos durante um máximo de até 11 dias consecutivos, uma vez ao dia (doses de 10, 20, 25, 50 mg/kg – protocolo repetido), ao longo dos quais diferentes testes comportamentais foram realizados 24 h após a última administração, bem como, análises *post mortem* dos tecidos dos animais ao final dos tratamentos. Foi selecionado o número de 11 dias de tratamento de forma a abarcar o maior número de testes comportamentais propostos sem prejudicar o bem-estar animal. Ao todo, 4 baterias comportamentais diferentes seguiram o protocolo repetido de 11 dias de tratamento, utilizando grupos independentes de animais para cada bateria e testes variados de acordo com cada bateria. A pesagem dos animais era realizada no momento da administração. Neste estudo, para se evitar efeitos tóxicos comprometedores, foi decidido selecionar doses de MGO de no máximo até 25% (≤ 200 mg/kg) da dose letal (800 mg/kg, i.p.) para camundongos (KALAPOS et al., 1991; CHOUDHARY et al., 1997). Foram feitos esforços para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados e cuidadosamente conduzidos de acordo com as normas previstas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC, protocolo n. 7245210616 – Anexo 1).

5.3.1. FASE I: Protocolo agudo

O protocolo agudo foi executado primeiro, visando detectar efeitos comportamentais variados e uma triagem para a seleção de doses para os testes do protocolo repetido. Para tanto, foi utilizado uma amplitude maior de doses, bem como, doses maiores (até 200 mg/kg). As doses utilizadas foram: 20, 50, 80 ou 200 mg/kg. Para os tratamentos agudos, os testes comportamentais foram realizados em períodos em torno do pico plasmático do MGO (4 h após injeção i. p. com elevação significativa a partir de 2 h) (GHOSH et al., 2006).

Assim, conforme o esquema da Figura 8, a execução do protocolo agudo foi realizada da seguinte forma: Manipulação dos camundongos (*Handling*) com marcação, pesagem e imediata injeção, seguido de sua ambientação na sala de experimentação até o momento do teste comportamental. Foram conduzidos testes a partir de 2 h ou 4 h após a administração, para a avaliação de parâmetros motores, comportamentos estereotipados e parâmetros cognitivos (teste do campo aberto, teste do poste, realocação de objeto e esquiva inibitória do tipo *step-down*). Neste protocolo, cada animal participou em apenas um dentre os testes comportamentais, e sua eutanásia ocorreu 6 h após a administração única de MGO (Fig. 8).

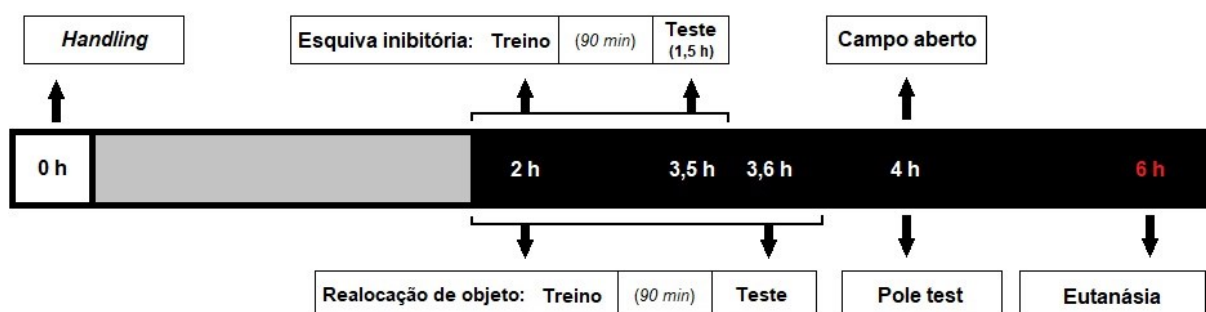


Figura 8. Escala temporal exibindo os testes comportamentais do protocolo de tratamento agudo da FASE I. Foi investigado o metilglioxal nas doses de 20, 80 ou 200 mg/kg, i. p., em camundongos. A administração ocorreu em 0 h. Cada animal participou de apenas um teste. (Fonte: do autor).

5.3.2. FASE II: Protocolo repetido

O protocolo repetido se concentrou em explorar os efeitos cognitivos e motores inicialmente encontrados através do protocolo agudo e ampliar o corpo de resultados não-agudos sobre o MGO. Portanto, os testes comportamentais iniciaram após 4 dias iniciais de tratamento e foram conduzidos ao longo do mesmo. Nesta fase, os tratamentos utilizaram MGO nas doses: 10, 25 ou 50 mg/kg. Foram realizados um conjunto de testes que integraram 2 baterias diferentes. Foram avaliados parâmetros motores: atividade locomotora, agilidade vertical, força e coordenação motora; interação social; comportamento tipo-depressivo e parâmetros cognitivos: memória de reconhecimento, memória espacial, memória aversiva e memória de trabalho, em paradigmas de curto e longo prazo, conforme os esquemas da Figura 9.

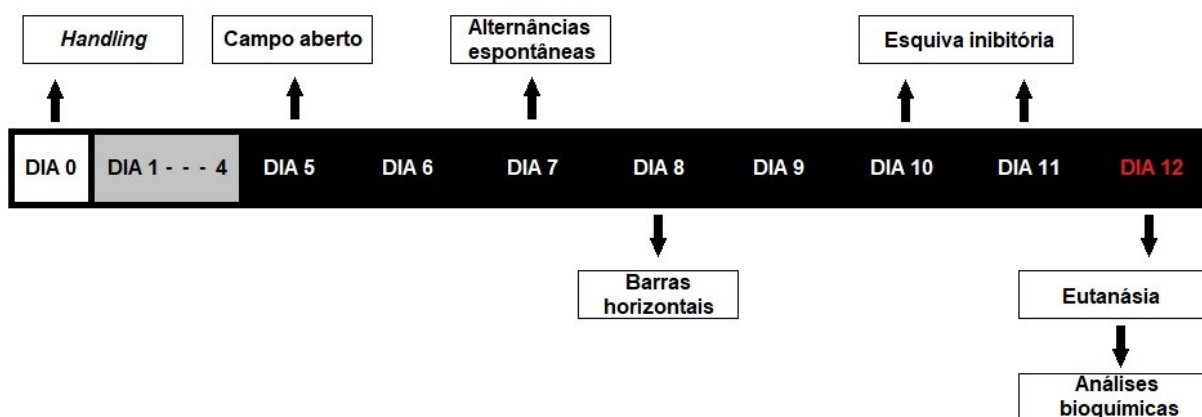
A execução do protocolo repetido foi realizada da seguinte forma: Manipulação dos camundongos (*Handling*) com marcação e pesagem no dia 0; Administração de MGO nos dias 1 - 11, esta realizada, uma vez ao dia, próxima ao final do ciclo claro, entre 17:00 h e 18:00 h; Os testes comportamentais foram realizados de forma sequencial a partir do dia 5 até o dia 11, sempre 24 h após a última administração (Fig. 9). Para evitar possíveis efeitos de administração aguda, bem como possíveis alterações fisiológicas abruptas nos camundongos, o tratamento foi realizado em concomitância com os testes comportamentais, sendo que o tratamento nos dias dos testes foi realizado 2 h após a conclusão do teste do dia. No dia 12, os camundongos foram eutanasiados por decapitação e amostras de sangue foram coletadas do coração para determinar os níveis de MGO no plasma. E o córtex pré-frontal e hipocampo foram coletados para determinar: os níveis de monoaminas (NA, DA, 5-HT), a atividade enzimática da Glo1 e a imunodeteção dos níveis das enzimas Glo1 e Glo2 e marcadores de peroxidação lipídica (4-HNE, MDA).

Após isso, uma única dose de MGO foi selecionada a partir dos resultados desta fase e empregada na FASE III para investigar em tratamento repetido, os potenciais sistemas de neurotransmissão e mecanismos envolvidos nas respostas mediadas pelo MGO.

A) Metilgloxal (10, 25 ou 50 mg/kg, i. p.)



B) Metilgloxal (10, 25 ou 50 mg/kg, i. p.)



○ Tratamentos: DIA 1 até DIA 11

Figura 9. Escalas temporais exibindo os testes comportamentais do protocolo de tratamento repetido de 11 dias da FASE II. Foi investigado o metilgloxal nas doses de 10, 25 ou 50 mg/kg, i. p., em camundongos. A administração ocorreu no dia 1 até o dia 11. Cada animal participou de apenas uma das duas baterias de testes comportamentais. (Fonte: do autor).

5.3.3. FASE III: Protocolo repetido

Essa fase objetivou uma avaliação comportamental dos efeitos do MGO de maneira mais focada e otimizada. Os testes se concentraram em avaliar a memória e a função locomotora e em desafio com outras substâncias.

Baseando-se nos resultados do protocolo repetido da fase antecedente, somente uma dose de MGO foi selecionada (50 mg/kg), de acordo com a maior efetividade em alterar o comportamento dos animais tratados. Isso permitiu uma redução no número de animais utilizados e no tempo de experimentação. Devido ao limite diário de animais que poderiam ser testados, isso também permitiu que grupos desafiados com o tratamento de outras drogas fossem empregados nos testes, para a investigação dos potenciais sistemas de neurotransmissão e mecanismos envolvidos nas respostas mediadas pelo MGO.

Dessa forma, seguindo o protocolo repetido, foram realizados um conjunto de testes que integraram 2 baterias diferentes, utilizando grupos independentes de animais para cada droga em cotratamento com MGO. Cada substância foi administrada uma vez ao dia, 30 min antes do MGO, ao final do ciclo claro (16:00 – 18:00 h), de acordo com o esquema da Figura 10: Na bateria A, o MGO (50 mg/kg), foi tratado em concomitância com salina (0,9% – controle) ou com apenas uma das seguintes drogas já conhecidas: Bupropiona (10 mg/kg), inibidor da recaptação de DA e NA; Cetamina (1 mg/kg), antagonista de NMDAR; Muscimol (0,5 mg/kg), agonista de GABA_AR; Bicuculina (2 mg/kg), antagonista de GABA_AR. E através dos testes foram avaliadas a atividade locomotora espontânea e as memórias de trabalho e espacial (Fig. 10A); E na bateria B, um novo antagonista do RAGE (FPS-ZM1) foi avaliado em tratamento repetido. Assim, durante 11 dias, tanto o MGO (50 mg/kg) quanto o ZM1 (2 mg/kg) foram tratados independentemente ou em conjunto. E através dos testes foram avaliadas a atividade locomotora e as memórias espacial, de trabalho e aversiva (Fig. 10B).

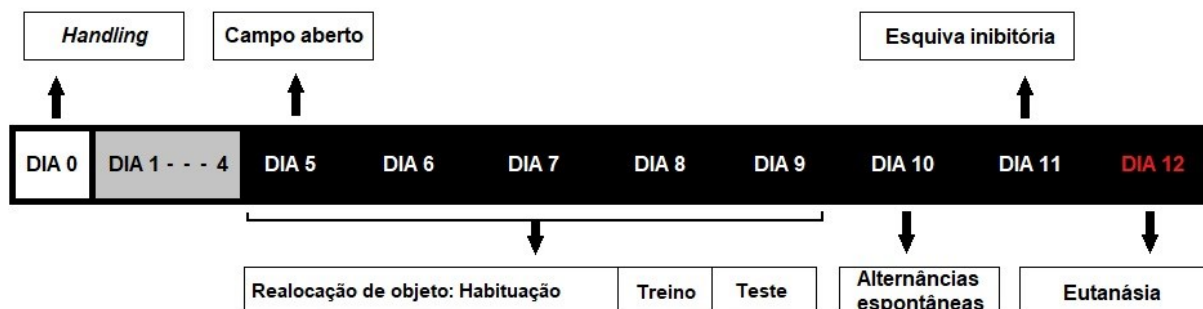
A) Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.) + Drogas



○ TRATAMENTOS: DIA 1 até DIA 11

- Controle (veículo, i. p./v. o.) + Controle (veículo, i. p.)
- Controle (veículo, i. p.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)
- Bupropiona (10 mg/kg, v. o.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)
- Cetamina (1 mg/kg, i. p.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)
- Muscimol (0,5 mg/kg, i. p.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)
- Bicuculina (2 mg/kg, i. p.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)

B) Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.) + FPS-ZM1



○ TRATAMENTOS: DIA 1 até DIA 11

- Controle (veículo, i. p.) + Controle (veículo, i. p.)
- Controle (veículo, i. p.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)
- FPS-ZM1 (2 mg/kg, i. p.) + Controle (veículo, i. p.)
- FPS-ZM1 (2 mg/kg, i. p.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)

Figura 10. Escalas temporais exibindo os testes comportamentais do protocolo de tratamento repetido de 11 dias da FASE III. Foi investigado em camundongos o metilglioxal (50 mg/kg, i. p.) unicamente ou em cotratamento com as drogas bupropiona (10 mg/kg, v. o.), cetamina (1 mg/kg, i. p.), muscimol (0,5 mg/kg, i. p.), bicuculina (2 mg/kg, i. p.) (A); ou metilglioxal (50 mg/kg, i. p.) e FPS-ZM1 (2 mg/kg, i. p.) unicamente ou em cotratamento (B). A administração ocorreu no dia 1 até o dia 11. As drogas foram administradas uma vez ao dia, 30 min antes do metilglioxal. Cada animal participou de apenas uma das duas baterias de testes comportamentais. (Fonte: do autor).

5.4. Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram conduzidos entre as 09:30 e 16:30 h em uma sala dedicada, acusticamente isolada, e com baixa iluminação (15 lx para os testes do campo aberto, realocação de objeto, reconhecimento de objeto; 30 lx para os demais testes comportamentais). Os experimentos foram registrados por sistema de câmera de vídeo e as imagens foram posteriormente analisadas usando o software ANY-maze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). Os camundongos foram ambientados para a sua aclimação na sala experimental durante no mínimo 2 h antes do início dos testes. Todos os grupos de diferentes tratamentos foram testados em paralelo no mesmo horário em cada dia de teste, de acordo com a bateria comportamental. Em testes que envolveram várias sessões, uma vez que o animal foi exposto ao paradigma, ele não foi misturado com camundongos ainda não expostos à mesma sessão quando do retorno à sua gaiola, de modo a equalizar as condições de teste entre todos os animais. Foram feitos esforços para minimizar o número de animais usados e seu sofrimento. Os testes comportamentais mencionados estão descritos abaixo:

5.4.1. Teste do campo aberto

A atividade locomotora espontânea e o comportamento tipo-ansioso dos animais foram avaliados em uma arena de campo aberto. No teste, cada animal foi colocado no centro da arena para explorar livremente o aparato por 5 min. O aparato foi feito com quatro paredes acrílicas transparentes (30 cm de altura) e piso cinza de 40 x 40 cm. Os parâmetros analisados foram a distância total percorrida (m), a velocidade média (m/min), o número de entradas e o tempo gasto pelo animal na região central da arena (s), o número e o tempo (s) de episódios de *grooming* e *rearing* e o tempo total que o animal permaneceu imóvel (s). A área da região central foi definida em 20 x 20 cm (BELZUNG, 1999). Os parâmetros foram registrados e posteriormente analisados usando o software especializado ANY-maze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA) (Fig. 11).

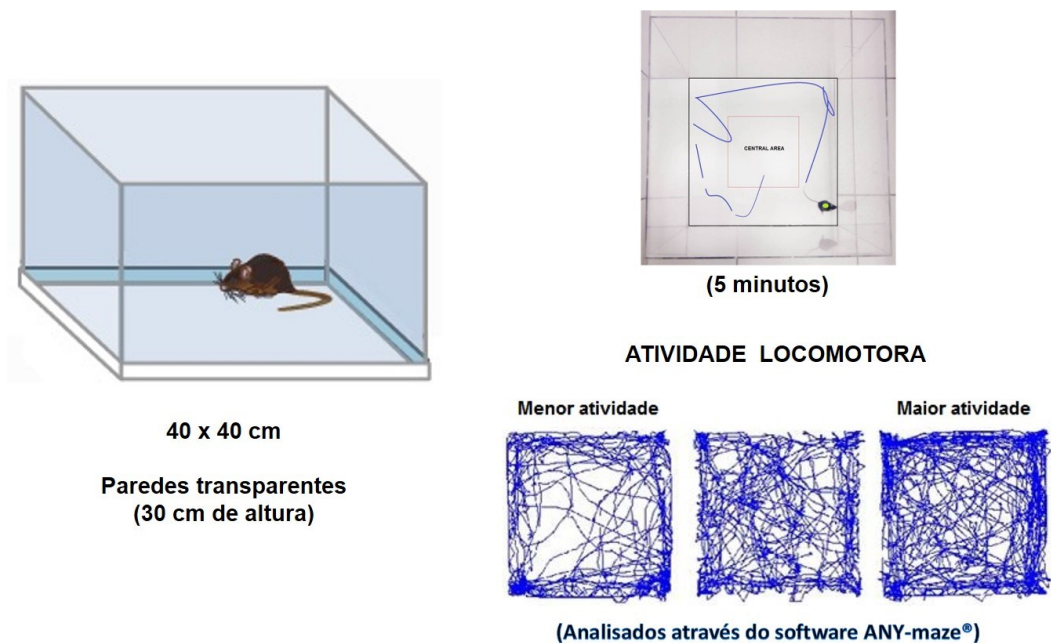


Figura 11. Teste do campo aberto. Avaliação da atividade locomotora espontânea e o comportamento tipo-ansioso. (Fonte: do autor).

5.4.2. Teste de suspensão pela cauda

Para a avaliação do comportamento tipo-depressivo foi utilizado o teste de suspensão pela cauda. O experimento consistiu em fixar a extremidade distal da cauda do animal a uma barra horizontal de madeira a 60 cm de altura do chão. O animal ficou preso à barra de madeira com uma fita adesiva no ângulo de 90° ao eixo longitudinal da cauda, mantendo-o na vertical, de cabeça para baixo. Condição na qual o comportamento do animal controle é se debater ou manter longas sequências de movimentos corporais continuados procurando apoios ou forçando seu próprio escape. A diminuição significativa de tempo desse comportamento, considerado por tal situação presumivelmente incômoda e inescapável para o animal, aumentando assim a sua imobilidade, está relacionado a comportamentos do tipo depressivo. Dessa forma, cada animal foi suspenso pela cauda durante 6 min sendo quantificado o tempo total de imobilidade (em segundos) do animal. A imobilidade foi definida pela ausência de movimentos iniciados, incluindo balanços passivos do corpo. O animal seria excluído do teste se ele escalasse de modo a se manter agarrado à sua cauda por um período de 3 segundos ou mais (STERU et al., 1985) (Fig. 12).



**A IMOBILIDADE DO ANIMAL
REGISTRADA POR
6 mm**

Altura de 60 cm do chão

**Imobilidade:
ausência de movimentos
iniciados, incluindo
balanços passivos do corpo.**

Figura 12. Teste de suspensão pela cauda. Avaliação do comportamento tipo-depressivo. (Fonte: do autor).

5.4.3. Teste de barras horizontais

A avaliação de força e coordenação motora dos animais foi realizada utilizando a versão tripla do teste de barras horizontais, de acordo com o protocolo anteriormente descrito por Deacon (2013). O aparato consistiu em uma barra de latão (38 cm de comprimento) mantida a 50 cm acima da superfície suspensa por duas colunas de madeira em cada extremidade da barra. As colunas foram firmemente presas a uma base de madeira pesada coberta por uma manta de 5 cm de espessura (para amortecer a queda dos animais). O componente da barra poderia ser substituído por uma de três barras, cada uma com diferentes diâmetros (2, 4 e 6 mm). No teste, cada animal foi levantado pela cauda permitindo-o agarrar a barra horizontal no ponto central apenas com as patas dianteiras. Então, o animal foi liberado imediatamente e o tempo foi registrado com um cronômetro até a queda do animal segurando-se na barra; ou se o mesmo tocasse uma das colunas da extremidade da barra com uma das pernas dianteiras; ou pelo tempo máximo de corte de 30 s. A pontuação do teste foi feita com base no tempo de latência (s) para a queda, da seguinte forma: caindo entre 1-5 s = 1; entre 6-10 s = 2; entre 11-20 s = 3; entre 21-30 s = 4; após 30 s = 5; tocar com uma pata dianteira o suporte da barra sem cair = 5. Em geral, a dificuldade dos animais em agarrar e segurar seu próprio corpo na barra aumenta com o aumento dos diâmetros das barras. A primeira exposição de cada animal foi à barra de 2 mm, se o animal conseguisse marcar 5 em qualquer uma das barras, então o mesmo seria testado em barras progressivamente mais espessas (barra de 4 mm e barra de 6 mm) após um período de repouso de 300 s por exposição. Cada animal foi testado apenas uma vez em cada uma das

diferentes barras, porém, caso a animal caísse da barra antes de 5 s, o teste seria repetido na mesma barra até três vezes ou menos na tentativa de se obter uma pontuação >1. Em cada barra, foi considerada sempre a melhor pontuação do animal. A pontuação final de cada animal foi o total acumulado das pontuações em cada uma das diferentes barras (DEACON, 2013) (Fig. 13).

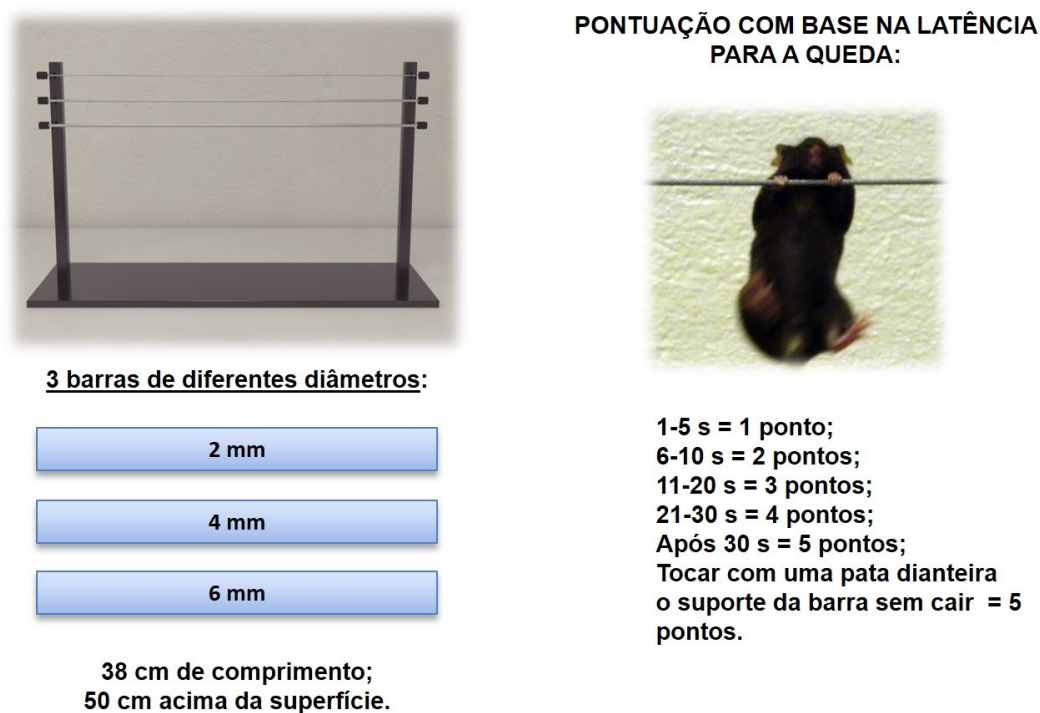


Figura 13. Teste de barras horizontais. Avaliação de força e coordenação motora. (Fonte: do autor).

5.4.4. Teste do poste

A coordenação motora dos animais também foi avaliada mensurando-se a agilidade vertical do animal na orientação e movimento do corpo. O teste do poste foi realizado com base em protocolos anteriormente descritos (OGAWA et al., 1985; FLEMING et al., 2004). Resumidamente, usando um poste de madeira vertical (50 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro) com uma superfície áspera colocada na caixa moradia do animal, cada animal foi colocado de cabeça para cima na parte superior e o tempo que o animal levou para orientar o seu próprio corpo verticalmente de cabeça para baixo (*t-turn*) e o tempo que passou para descer (*t-descend*) todo o comprimento do poste de volta para a sua caixa moradia foram gravados. No

dia do teste, os animais foram testados em cinco ensaios, apenas o menor tempo foi considerado em cada parâmetro. Caso o animal escorregasse ou caísse do poste, ou se não pudesse orientar-se para baixo completamente, o valor de 120 s (tempo de corte) seria aplicado (Fig. 14).



Poste:
50 cm de comprimento;
1,5 cm de diâmetro.



PARÂMETROS:

T-turn: tempo para orientar o corpo verticalmente;

T-descend: tempo de descida até o chão.

5 ensaios
(120 s tempo limite)

Somente a performance de menor tempo é contabilizada

Figura 14. Teste do poste. Avaliação de coordenação motora. (Fonte: do autor).

5.4.5. Teste de interação social

Para a avaliação da interação social de camundongos foi realizado o teste de interação social, adaptado do teste de preferência social de três câmaras, originalmente descrito por Kazdoba e colegas (2016). O aparato do teste, em acrílico de cor ocre não transparente, consistiu de duas câmaras de 20 x 14 cm (e 30 cm de altura) transversalmente separadas por uma parede de 1 cm de espessura com uma abertura de 7 cm ligando ambas as câmaras. O teste foi realizado em duas fases. Na primeira fase (habituação), o animal a ser testado foi colocado no centro de uma das duas câmaras e deixado explorar livremente as câmaras por 5 min. Após isso, na segunda fase (sociabilidade) um outro animal de mesma linhagem, idade e sexo, porém criado em outro biotério e desconhecido pelo animal testado, foi introduzido em uma das duas

câmaras, colocado preso sob um copo metálico de 11 cm de altura, fundo sólido de 10,5 cm de diâmetro e paredes em grade feitas de barras de aço inoxidável espaçadas em intervalos de 1 cm (não permitindo a interação tátil agressiva, mas sim a comunicação olfativa e acesso visual e auditivo). Na fase de sociabilidade, ambos os animais foram testados por 10 min. A câmara na qual o animal novo foi introduzido consistiu na câmara de interação e o tempo que o animal a ser testado gastou nessa câmara foi cronometrado, e correspondeu ao tempo relativo à interação social. Como parâmetro de atividade locomotora, o número de entradas do animal de uma câmara para a outra também foi contabilizado. De forma geral, durante o tempo de 10 min da segunda fase, a presença de um novo animal gera maior interesse exploratório, resultando em um tempo maior gasto pelo animal testado (livre nas câmaras) próximo ao animal desconhecido e um tempo menor deste na câmara vazia. A posição relativa de introdução dos animais e a formação da câmara de interação, entre as câmaras do aparato, foi contrabalanceada de forma aleatória entre os grupos (CHANG et al., 2017) (Fig. 15).



2 câmaras de 20 x 14 cm (e 30 cm de altura)

5 min de habituação /
10 min com animal desconhecido (estranho)



Interação tátil/olfativa
e acesso visual e auditivo
com animal desconhecido

(10 min)

PARÂMETROS:

Interação social = Tempo total na câmara de interação;

Atividade locomotora = Número de entradas entre câmaras.

Figura 15. Teste de interação social. Avaliação da interação social. (Fonte: do autor).

5.4.6. Teste de realocação de objeto

A memória espacial dos animais foi avaliada usando o teste de realocação de objeto para avaliar a memória de curto ou longo prazo.

A avaliação da memória espacial de curto prazo foi realizada com base no protocolo anteriormente descrito por Assini et al. (2009). No paradigma, cada animal foi habituado na arena do campo aberto com paredes transparentes por 5 min (sessão de habituação). Depois, após 24 h, os animais foram colocados na mesma arena com dois objetos idênticos (5 x 3 cm) por 5 min (sessão treino) e após um período de 90 min, um dos objetos foi movido para uma nova localização (sessão teste). O tempo gasto pelo animal explorando os objetos, durante 5 min, nos locais novo (*novel*) e antigo (*familiar*) foi registrado. Os dois objetos eram idênticos e foram colocados a 30 cm de distância um do outro e a 7 cm de distância das paredes. A posição relativa do objeto realocado foi contrabalanceada entre os camundongos testados. Pistas visuais foram adicionadas na sala de teste para servir como referência espacial: estas incluíam objetos diferentes, organizados assimetricamente, colocados próximos do lado de fora da arena do campo aberto e uma fita preta (30 x 5 cm) que foi colada perpendicularmente ao lado de fora de uma das paredes transparentes da arena. As pistas visuais permaneceram inalteradas e nos mesmos lugares durante todas as diferentes sessões do teste.

Na sessão teste, a exploração do objeto no local novo por mais de 50% do tempo ao acaso foi considerada indicativo da retenção de memória. O tempo de exploração foi computado usando cronômetros. O comportamento exploratório foi considerado quando os animais cheiraram, tocaram ou olharam os objetos a menos de 1 cm de distância. Para analisar o desempenho cognitivo com base no tempo de exploração relativo de cada animal, calculou-se um índice de localização: $(T_{novel} \times 100)/(T_{novel} + T_{familiar})$, onde T_{novel} é o tempo gasto explorando o objeto realocado e $T_{familiar}$ é o tempo gasto explorando o objeto não realocado (VOGEL-CIERNIA & WOOD, 2014). Com esse protocolo aqui descrito, foi testado uma administração aguda: a habituação e as sessões de treino foram realizadas 2 h após a administração de 20 mg/kg de MGO nos animais; e também uma administração repetida não aguda (tratamento durante 6 dias de 20 mg/kg de MGO): as sessões de habituação e treino foram realizadas no 7º dia, 24 h após a última administração de MGO.

Além disso, foi realizada também a avaliação da memória espacial de longo prazo. Após um pré-tratamento de 4 dias com MGO, foi utilizado um protocolo modificado do descrito acima para investigar os efeitos não agudos de diferentes doses (10, 25, 50 mg/kg) do tratamento repetido com MGO. Este protocolo incluiu: utilizar o chão do aparato do campo

aberto coberto com maravalha (camada com 1 cm de altura); 2 a 3 dias de sessões de habituação de 5 min (1 sessão por dia); seguido de 1 dia com uma sessão treino de 10 min; e a sessão teste de 5 min realizada 24 h após a sessão treino (VOGEL-CIERNIA & WOOD, 2014). Assim, foi decidido aumentar o número de sessões de habituação e as condições do chão, em virtude desta medida aumentar o tempo médio de exploração dos objetos pelos animais na sessão treino (aprendizado), conforme observado através dos experimentos do presente estudo. O aumento no número de sessões de habituação (5 min), tanto para 2 ou 3 dias, e o tempo da sessão treino (10 min), utilizando uma superfície familiar ao camundongo, refletiu em um aumento de 8 vezes no tempo médio de exploração dos objetos (ou 88%). Dessa forma, o aumento do tempo médio de exploração reduziu as variações aleatórias entre grupos, permitindo dados mais confiáveis para o cálculo de índice de exploração e sua análise estatística (Fig. 16A).

5.4.7. Teste de reconhecimento de objeto

De forma semelhante à avaliação da memória espacial de longo prazo, a memória de reconhecimento de longo prazo dos animais foi avaliada usando o teste de reconhecimento de objeto.

O teste foi realizado com 3 dias de sessões de habituação de 5 min (1 sessão por dia); seguido de 1 dia com uma sessão treino de 10 min; e a sessão teste de 5 min foi realizada 24 h após a sessão treino. As diferenças nesse teste em comparação com o teste de realocação de objeto incluíram: na sessão teste, um dos objetos idênticos foi removido e substituído no mesmo local por outro objeto (objeto novo) possuindo as mesmas dimensões, mas com forma diferente; e nenhuma pista visual foi encorajada na sala experimental a ser usada como referência espacial, a sala estava vazia ao máximo possível para a execução do teste, incluindo ausência de fita sobre a parede do aparato, nem objetos deliberadamente colocados ao seu redor. A exploração do objeto novo por mais de 50% do tempo ao acaso foi considerado o indicativo de retenção de memória (VOGEL-CIERNIA & WOOD, 2014) (Fig. 16B).

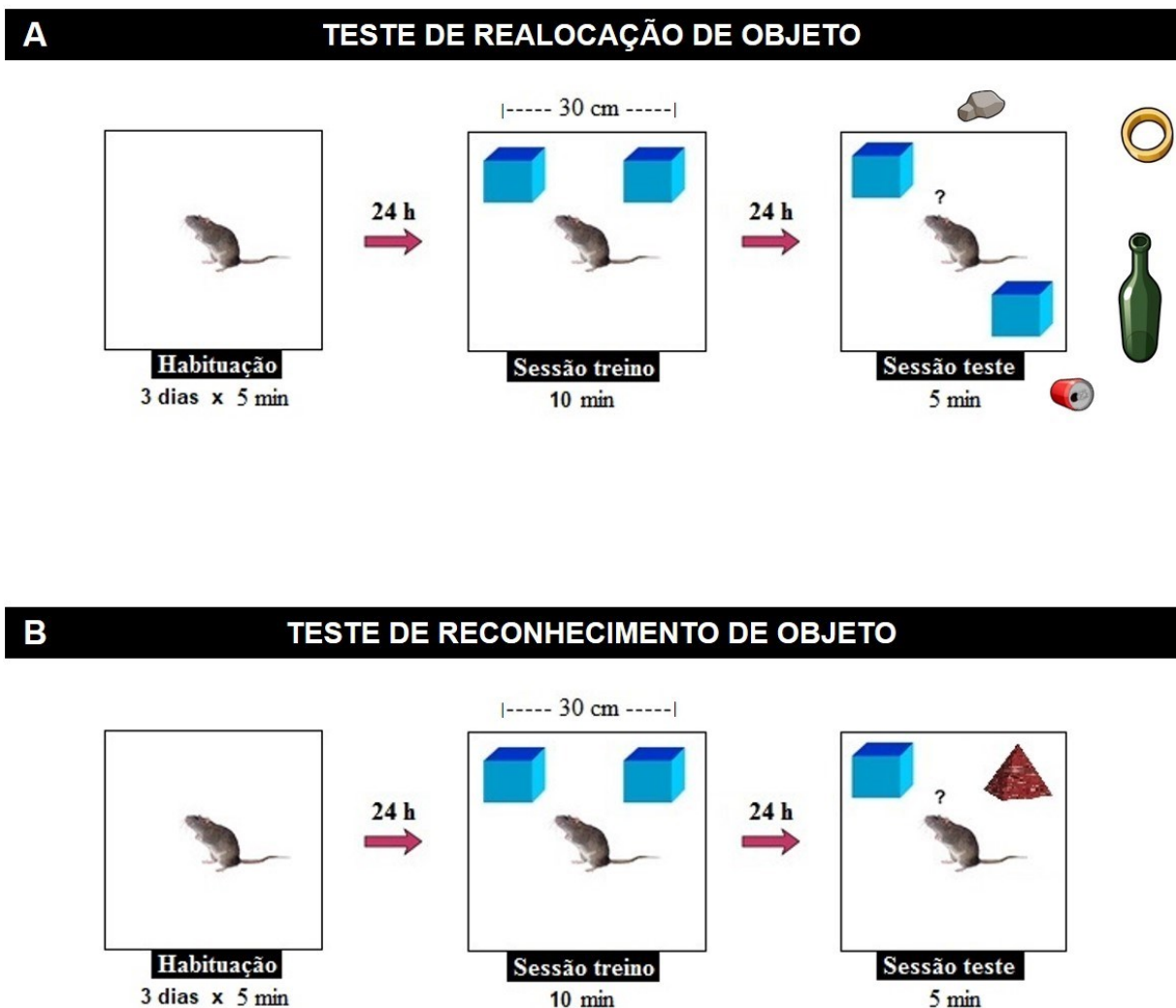
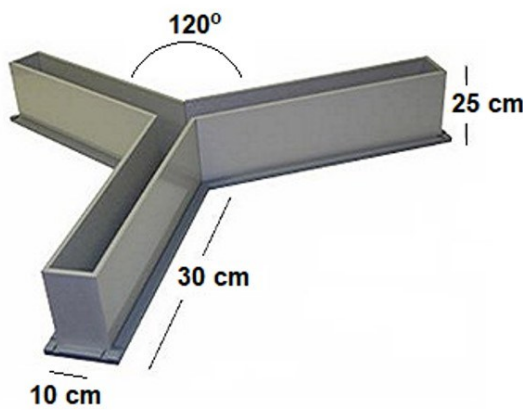


Figura 16. Testes de realocação de objeto e reconhecimento de objeto. A) Teste de realocação de objeto para a avaliação da memória espacial; B) Teste de reconhecimento de objeto para a avaliação da memória de reconhecimento. (Fonte: do autor).

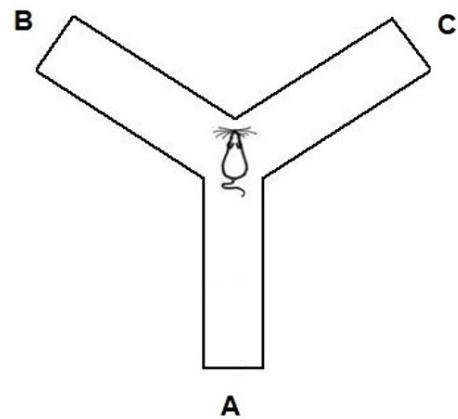
5.4.8. Teste de alternância espontânea

A avaliação da memória de trabalho dos animais foi realizada medindo a taxa de alternância espontânea. Quando deslocam-se de um lugar para outro, os roedores exibem a tendência natural de explorar a área menos visitada ou uma área previamente conhecida que sofreu mudanças (novidade), esse comportamento é referido como alternância espontânea (TOLMAN, 1925). A alternância espontânea foi avaliada usando um labirinto em forma de Y, feito de acrílico cinza opaco (Plexiglas), com três braços iguais (30 cm de comprimento, 10 cm

de largura, 25 cm de altura), dispostos em um ângulo de 120° entre si e conectados por uma área triangular central (zona neutra). No teste, cada animal foi colocado sobre a zona neutra permitindo-o explorar toda a área do labirinto durante 5 min. Cada entrada em algum dos braços do labirinto foi computada somente quando o animal entrasse com as quatro patas. O número total de entradas de braço (N) foi utilizado como um parâmetro da atividade locomotora. O número de "trípletes corretos" (M, escolhas de entrada em cada um dos três braços de forma consecutiva sem reentradas) foi calculado como uma medida de alternância espontânea. A taxa de alternância foi calculada de acordo com a fórmula: $R (\%) = M \cdot 100 / (N - 2)$. A taxa de alternâncias foi positivamente relacionada com melhor desempenho da memória de trabalho (DEMBER & FOWLER, 1958; KLESCHEVNIKOV et al., 2017) (Fig. 17).



LABIRINTO EM Y



O número total de entradas e a taxa de "trípletes corretos"

$$R (\%) = M \cdot 100 / (N - 2)$$

Cada animal colocado no centro do aparato para explorar livremente.

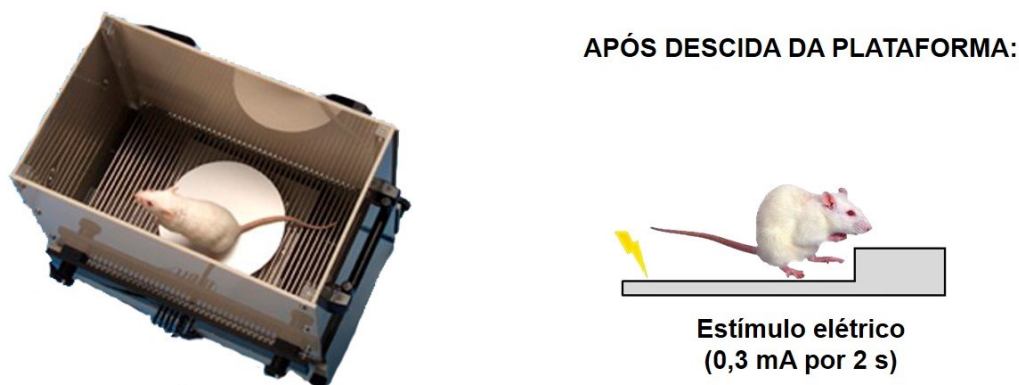
(5 minutos)



Figura 17. Teste de alternância espontânea. Avaliação da memória de trabalho. (Fonte: do autor).

5.4.9. Teste de esquiiva inibitória do tipo *step-down*

Para avaliar a memória aversiva de curto e longo prazo, os animais foram ao teste de esquiiva inibitória do tipo *step-down*. O aparato desse teste foi uma caixa de 23 x 21 x 21 cm³ de acrílico e aço com o chão formado por uma grade de barras paralelas de aço inoxidável de 4 mm de diâmetro espaçadas a 1 cm uma da outra. Uma plataforma de vinil de 11 x 8 cm de largura e 3 cm de altura foi colocada no centro sobre a grade de barras. Com base em procedimentos descritos anteriormente (ROESLER et al., 1999; MOREIRA et al., 2012), cada animal foi colocado sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade com as quatro patas foi registrada em segundos com um cronômetro. Durante a sessão treino, imediatamente após o animal descer da plataforma sobre a grade, o mesmo recebeu um choque elétrico nas patas durante 2 s (0,3 mA), depois o mesmo foi transferido para a sua caixa moradia. Esse teste baseia-se no habitual comportamento do animal de evitar descer da plataforma ou permanecer um tempo maior em uma reexposição ao mesmo ambiente, após ter recebido o estímulo elétrico. Para avaliar a retenção de memória, as sessões de teste foram realizadas 1,5 h (curto prazo) e 24 h (longo prazo) após a sessão treino. As sessões teste foram idênticas à sessão treino, exceto que nenhum choque elétrico foi dado. Cada animal foi testado em ambas as sessões teste e um limite máximo de 180 s por sessão foi esperado para cada animal em descer com as quatro patas. A medida de retenção de memória nessa tarefa consistiu em um atraso na latência do animal em descer da plataforma na sessão teste em comparação com a sessão treino (Fig. 18).



Duas sessões de no máximo 3 min com intervalos:

1,5 h - Memória de curto prazo

24 h - Memória de longo prazo

Figura 18. Teste de esquila inibitória do tipo *step-down*. Avaliação da memória aversiva. (Fonte: do autor).

5.5. Análises bioquímicas

5.5.1. Metilglioxal plasmático

Os níveis de MGO foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com 1,2-diamino-4,5-metilenodioxibenzeno (DMB) por detecção fluorimétrica, conforme previamente descrito por Ogasawara et al. (2016). Resumidamente, o sangue foi coletado em tubos revestidos com heparina, centrifugado a 800 x g, por 15 min a 4 °C. O plasma foi separado e misturado (1:1, v/v) com a solução de derivatizante (beta-mercaptoetanol 1 M, ditionito de sódio 28 mM e DMB 7 mM). Uma curva padrão foi realizada com uma concentração variando de 0,050 a 5 µM e usada para estimar a concentração de MGO. O aparelho de HPLC utilizado era da Jasco® (sistema LC-2000 Plus), usando um Inerstil ODS-4®; Coluna de 4,6 x 150 mm, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O derivado DMB-MGO foi eluído em solução isocrática de metanol, acetonitrilo e água, na respectiva razão: 35:10:55. A fluorescência foi monitorada utilizando uma excitação a 355 nm e uma emissão a 399 nm.

5.5.2. Quantificação de monoaminas encefálicas

Os níveis de monoaminas foram determinados por HPLC com detecção fluorométrica de acordo com De Benedetto et al. (2014). O hipocampo e o córtex pré-frontal dos animais foram homogeneizados em ácido perclórico 0,2 M contendo 3 mM de cisteína a 1:5 (p:v). O homogenato foi centrifugado (12.000 x g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante resultante foi congelado (-80 °C) para a análise subsequente. Uma curva padrão foi realizada com concentrações variando de 0,016 a 2,50 ng/μL e utilizada para estimar os níveis de dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT). O aparelho de HPLC utilizado era da Jasco® (Sistema LC-2000 Plus), utilizando uma coluna ACE® C18 Ultra-Inert, a um fluxo de 0,6 mL/min. As monoaminas foram eluído em solução isocrática de acetato (ácido acético 12 mM, EDTA 0,26 mM)/metanol (86:14 v/v). A fluorescência foi monitorada utilizando excitação a 279 nm e emissão a 320 nm.

5.5.3. Conteúdo de proteínas do sistema das glioxalases

Os níveis de proteína da Glo1 e Glo2 foram estimados por western blotting no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais. As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl a 150 mM, NP-40 a 1%, coquetel inibidor de proteases a 1%, PMSF 100 mM). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e as proteínas eletrotransferidas dos géis para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), previamente ativadas com metanol. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado (5%) e imunotestadas para Glo1 (Santa Cruz Biotechnology: SC 67351, diluição de 1:1000), Glo2 (Santa Cruz Biotechnology: SC 51092, diluição de 1:1000). A intensidade de banda foi normalizada com solução do corante ácido vermelho (Ponceau S) (Protocolos Abcam®, 2018). As imagens foram obtidas utilizando técnicas de quimiluminescência padrão e registradas pelo aparelho fotodocumentador Chemidoc® (ChemiLab, BioRad, La Jolla). Após, as bandas das imagens obtidas foram quantificadas pelo software ImageJ (<https://image.j.nih.gov/ij/>).

5.5.4. Avaliação da peroxidação lipídica por dot blotting

Os danos oxidativos celulares foram avaliados por mensuração indireta da peroxidação lipídica através da quantificação dos níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA) por dot blotting. Amostras do hipocampo e do córtex pré-frontal dos animais foram homogeneizadas em tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl a 150 mM, NP-40 a 1%, coquetel inibidor de proteases a 1%, PMSF 100 mM). Aplicou-se então, em membranas de PVDF ativadas com metanol, 5 µg de proteína (volume de 2 µL) em diferentes pontos aleatórios de maneira a formar duplicatas de cada grupo. Aguardou-se a secagem das membranas à temperatura ambiente, e após as mesmas foram bloqueadas com leite desnatado 5%, lavadas e incubadas por aproximadamente 8 h com os anticorpos primários para 4-HNE (ab46545: Abcam, diluição de 1:10000) e para MDA (ab6463: Abcam, diluição de 1:5000). Após a lavagem dos anticorpos primários, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários apropriados. Para controle de carga proteica, as membranas foram coradas com solução do corante Azul Brillhante de Coomassie G-250 (Coomassie blue). As imagens foram obtidas utilizando técnicas de quimiluminescência padrão e registradas pelo aparelho fotodocumentador Chemidoc® (ChemiLab, BioRad, La Jolla). A intensidade dos pontos foi quantificada por software proprietário (Protocolos Abcam®, 2018).

5.5.5. Atividade da enzima glioxalase 1 (Glo1)

A enzima glioxalase 1 (Glo1) catalisa a formação de S-D-lactoilglutathiona a partir do hemitioacetal (produto formado pela conjugação espontânea entre MGO e GSH) (THORNALLEY, 1993). A mensuração da sua atividade foi realizada através da formação de S-D-lactoilglutathiona, com base em Racker (1951) e Thornalley et al. (1993). Cada amostra fria foi banhada em tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico), 20 mM, pH 7,0 (1:10 - peso:volume) e homogeneizados. Após, os homogenatos foram centrifugados a $20.000 \times g$, a 4 °C durante 15 min e o sobrenadante resultante foi recuperado. Uma alíquota foi separada para a determinação da quantidade proteica pelo método de Bradford, usando a albumina do soro bovino como proteína padrão (BRADFORD, 1976). Para o ensaio enzimático, GSH (100 mM) e MGO (100 mM) foram incubados em tampão fosfato 50 mM, pH 6,7, a 37 °C por 10 min. Essa, por sua vez, foi adicionada ao meio de reação seguindo concentrações crescentes de MGO, até 10 mM. Após, o sobrenadante da amostra foi

adicionado ao meio de reação e a taxa de aumento da absorbância foi medida durante 1 min a 240 nm em espectrofotômetro TECAN®. Os valores de absorbância sem a adição da amostra foram descontados das leituras. Ao final, a atividade enzimática foi relativizada respectivamente à concentração de proteína determinada de cada amostra. Os dados foram expressos como nmol de substrato hidrolisado por mL por min.

5.6. Análise estatística

Os testes foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls, senão, teste *t* de Student, quando da presença de apenas dois grupos experimentais, ou para comparações adicionais, exceto: I) Os testes de realocação de objeto e reconhecimento de objeto foram analisados usando o teste *t* de Student, comparando os valores dos índices de localização ou reconhecimento com o desempenho aleatório (50%) de exploração de cada um dos dois objetos do teste; II) No caso do teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*, que resultou na distribuição não normal dos dados, a análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido da comparação de Dunn. O nível de significância aceito foi $p \leq 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o pacote de software STATISTICA®, versão 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E. P. M.) ou mediana (intervalo interquartil). Os gráficos foram elaborados com o auxílio do software GraphPad Prism®, versão 5.00, para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

6. RESULTADOS

6.1. PARTE 1: Avaliação comportamental I

6.1.1. Efeitos do tratamento agudo com metilglioxal sobre a atividade locomotora de camundongos

Para uma primeira avaliação dos efeitos do MGO, foi realizado um teste preliminar sobre a atividade locomotora dos animais (Fig. 19). Após 4 h de uma única administração i. p. de MGO (doses de 20, 80, 200 mg/kg), os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (5 min). Através do teste ANOVA de uma via, observou-se que a administração da dose mais baixa (20 mg/kg) não apresentou nenhuma alteração da distância percorrida pelos animais em comparação aos animais controle (Fig. 19A). Contudo, com as doses de 80 e 200 mg/kg, revelou-se um efeito significativo [$F_{(3,28)} = 11,685$; $p < 0,05$], onde o MGO reduziu, de maneira dose-dependente, a distância percorrida em comparação ao grupo controle (Fig. 19A). Os animais tratados com MGO nas doses de 80 e 200 mg/kg, também exibiram uma menor velocidade média no campo aberto (Fig. 19B) quando comparados ao controle [$F_{(3,28)} = 11,699$; $p < 0,05$]. Além disso, em comparação com o grupo controle, os grupos tratados com MGO (80 e 200 mg/kg) apresentaram diminuição no número de entradas [$F_{(3,27)} = 15,518$; $p < 0,05$] (Fig. 19C) e diminuição do tempo gasto na área central [$F_{(3,28)} = 4,528$; $p < 0,05$] (Fig. 19D) do campo aberto.

Além disso, os animais tratados com MGO (200 mg/kg) apresentaram menos episódios [$F_{(3,20)} = 3,2198$; $p < 0,05$] (Fig. 19E) e tempo de *grooming* [$F_{(3,20)} = 1,9385$; $p < 0,05$] (Fig. 19F), assim como, menos episódios [$F_{(3,20)} = 9,6617$; $p < 0,05$] (Fig. 19G) e tempo de *rearing* [$F_{(3,20)} = 7,0832$; $p < 0,05$] (Fig. 19H), quando comparados ao controle. Além disso, MGO (200 mg/kg) induziu aumento do tempo de imobilidade dos animais no campo aberto, quando comparado ao controle [$F_{(3,25)} = 24,479$; $p < 0,05$] (Fig. 19I).

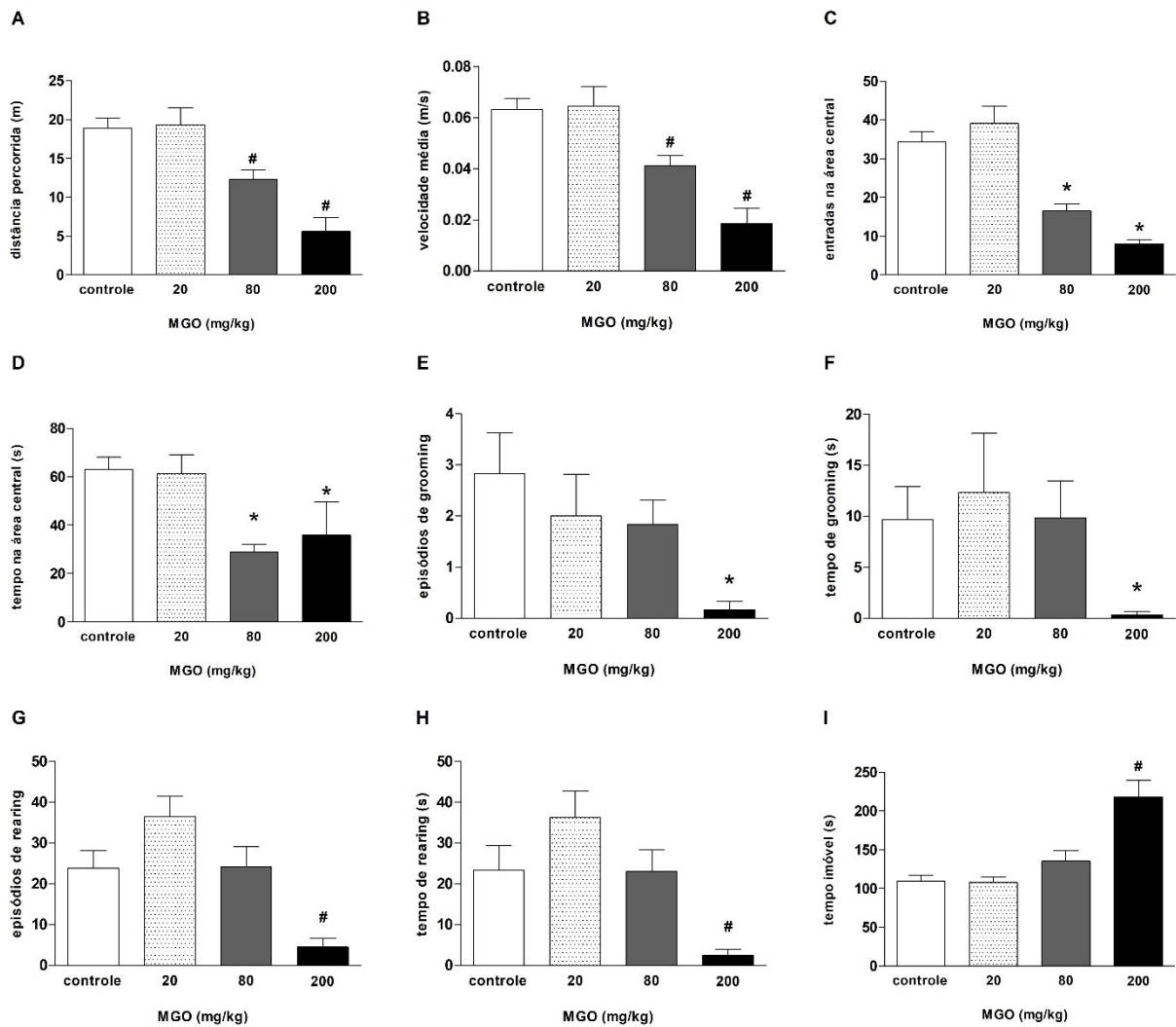


Figura 19. Efeitos do metilglioxal (20, 80 ,200 mg/kg, i. p.) sobre a atividade locomotora de camundongos, após tratamento agudo (4 h). Os animais foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto e os seguintes parâmetros analisados: A) distância percorrida (m); B) velocidade média (m/min); C) número de entradas e D) tempo gasto (s) na área central; E) episódios de grooming; F) tempo de grooming (s); G) episódios de rearing; H) tempo de rearing (s); I) tempo de imobilidade (s); de camundongos durante 5 min no teste do campo aberto. As barras representam a média \pm E. P. M. de 6-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado a todos os grupos (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

Com este teste preliminar, pode-se observar que a atividade locomotora dos animais foi severamente afetada nas doses de MGO 80 e 200 mg/kg. Por esta razão, estas doses foram evitadas nos testes comportamentais em tratamentos subsequentes. Testes adicionais demonstraram que a dose de 50 mg/kg em uma única administração de MGO, e avaliada 4 h após no campo aberto, não foi capaz de induzir alterações na atividade locomotora dos animais, em comparação com o controle, incluindo a distância total percorrida [$t_{(14)} = 0.734$; $p > 0,05$]

(Fig. 20) ou outros parâmetros relacionados (dados não mostrados). Dessa forma, a dose de 50 mg/kg de MGO se mostrou segura para ser empregada nos protocolos agudo ou repetido.

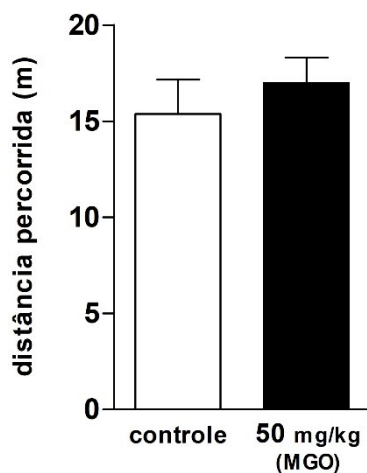


Figura 20. Efeitos do metilglioxal (50 mg/kg, i. p.) sobre a atividade locomotora de camundongos, após tratamento agudo (4 h). A distância percorrida pelos animais foi registrada durante 5 min no teste do campo aberto. As barras representam a média \pm E. P. M. de 8 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças estatísticas (teste *t* de Student).

6.1.2. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal sobre a atividade locomotora de camundongos

Os resultados mostraram que os animais tratados agudamente com MGO apresentam uma diminuição da atividade locomotora nas doses de 80 e 200 mg/kg (Fig. 19). Portanto, o teste do campo aberto também foi realizado após o tratamento repetido para doses até 50 mg/kg. Neste caso, o teste serviu para verificar, não somente o possível efeito hipolocomotor do MGO, como também para assegurar que as doses utilizadas para os testes comportamentais subsequentes não comprometeriam os resultados. Assim, após 4 dias com uma administração diária de MGO, nas doses de 10, 25 ou 50 mg/kg, os camundongos tratados não apresentaram alterações no teste de campo aberto. Todos os parâmetros analisados não diferiam do grupo controle, incluindo distância total percorrida, velocidade média, número de entradas e tempo gasto na área central da arena do campo aberto ou tempo de imobilidade (Tabela 1). Além disso, não foram encontradas diferenças em comportamentos estereotipados (*grooming* e *rearing*).

A análise minuto a minuto da distância percorrida na arena do campo aberto, realizada através do software ANY-maze® (Fig. 21A), mostrou que os grupos reduziram progressivamente a locomoção durante os 5 min de teste. Sendo este um fenômeno de aprendizado/habituação normal. O comportamento dos animais tratados com MGO não diferiram significativamente do grupo controle. Além disso, não houve diferenças no comportamento normal de tigmotaxia (preferência pela periferia) dos animais (BELZUNG, 1999), conforme apresentado pelos mapas de ocupação espacial de cada grupo durante o teste, gerados através do software ANY-maze® (Fig. 21B).

Tabela 1. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal (MGO) no campo aberto.

MGO (mg/kg)	Distância percorrida (m)	Velocidade média (m/min)	Entradas na área central	Tempo na área central (s)	Tempo de imobilidade (s)
Controle	16.9 ± 1.180	0.056 ± 0.003	27.7 ± 3.35	48.0 ± 4.69	106 ± 6.81
10	16.8 ± 0.816	0.055 ± 0.002	32.0 ± 2.67	54.0 ± 3.39	102 ± 5.75
25	14.6 ± 0.991	0.048 ± 0.003	24.5 ± 1.80	53.9 ± 7.34	129 ± 8.86
50	14.2 ± 0.849	0.047 ± 0.002	24.0 ± 2.79	43.0 ± 5.25	127 ± 8.51

Os dados estão apresentados como média ± E. P. M. de 11-12 animais por grupo.

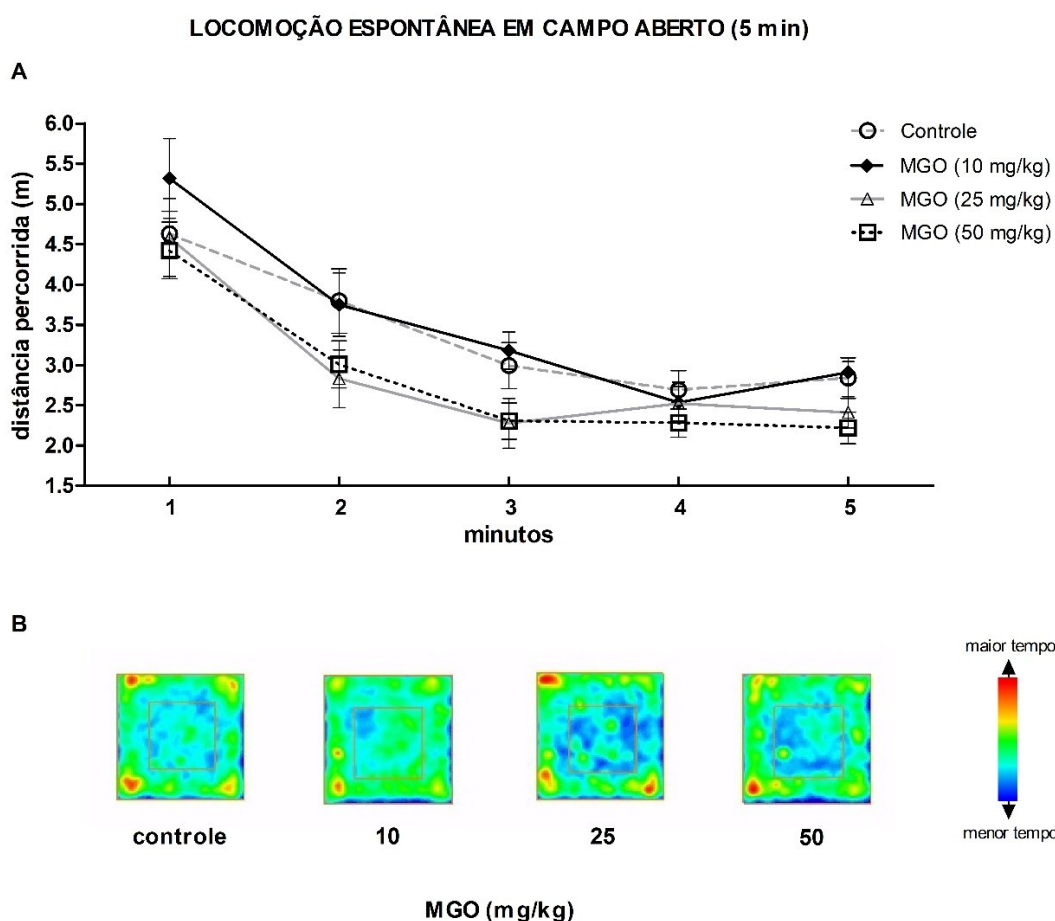


Figura 21. Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) em camundongos sobre a atividade locomotora. A) habituação locomotora; B) ocupação espacial durante 5 min na arena do campo aberto (40 x 40 cm – cores mais quentes representam maior tempo); 24 h após a última administração (4 dias). As barras representam a média ± E. P. M. de 11-12 animais por grupo. As barras representam a média ± E. P. M. de 11-18 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças estatísticas (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

O teste do campo aberto também foi realizado ao fim do tratamento repetido (dia 11) e novamente não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nos mesmos parâmetros anteriormente citados (dados não mostrados). Dessa forma, a partir dos resultados do campo aberto, foi demonstrado que 24 h após o tratamento repetido com MGO não foram observadas alterações de comportamento relacionadas à ansiedade nem alterações em parâmetros locomotores. Assim, as doses de MGO de 10, 25 e 50 mg/kg foram empregadas no tratamento repetido para os demais testes.

6.1.3. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a atividade locomotora, força e coordenação motora de camundongos

Outros efeitos sobre a função motora, além da locomoção, podem não ser detectados no campo aberto. Assim, os efeitos do tratamento com MGO sobre a coordenação motora e força foram avaliados através do teste do poste e o teste de barras horizontais, com grupos independentes de animais (Figs. 22 e 23).

Considerando que o MGO causou diminuição de *grooming* e *rearing* e aumento de imobilidade no campo aberto, quando tratado agudamente na dose de 200 mg/kg (Fig. 19), foi decidido avaliar o possível envolvimento de comprometimento motor. Assim, os animais receberam uma única administração de MGO (20, 80 e 200 mg/kg, i. p.) e foram testados após 4 h no teste do poste. O tempo em que os animais levaram para se orientar para baixo (*t-turn*) [$F_{(3,43)}= 1,5866$; $p > 0,05$] (Fig. 22A) e o tempo para descer do poste (*t-descend*) [$F_{(3,43)}= 2,3082$; $p > 0,05$] (Fig. 22C) não foram alterados pelo tratamento agudo com MGO.

Os animais também foram tratados diariamente com MGO (10, 25 e 50 mg/kg, i. p.) durante 7 ou 9 dias para o teste de barras horizontais ou o teste do poste, respectivamente. Neste caso, no teste do poste, o tempo que os animais levaram para se orientar para baixo (*t-turn*) [$F_{(3,58)}= 0,82056$; $p > 0,05$] (Fig. 22B) e o tempo para descer do poste (*t-descend*) [$F_{(3,67)}= 0,86742$; $p > 0,05$] (Fig. 22D) não foram alterados pelo tratamento com MGO em comparação com o controle.

No teste de barras horizontais, a ANOVA de uma via revelou que as pontuações entre todos os grupos, baseado nas latências de queda nas três diferentes espessuras de barras (2, 4 e 6 mm) não diferiu significativamente em comparação com o grupo controle [$F_{(3,44)}= 0,92713$; $p > 0,05$] (Fig. 23).

A partir dos dados obtidos, concluiu-se que o tratamento agudo ou repetido com MGO não foi capaz de alterar a coordenação motora e a força dos animais nas diferentes doses testadas.

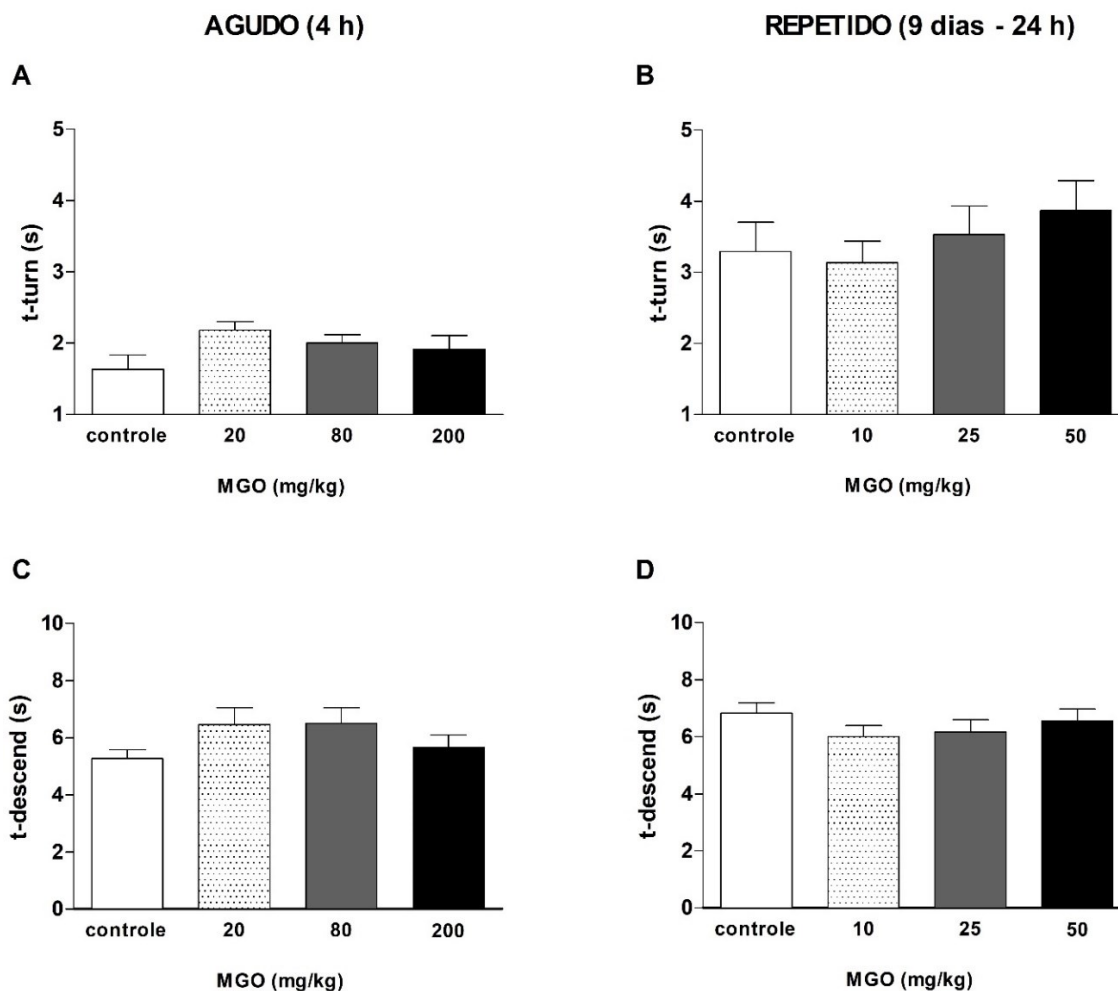


Figura 22. Efeitos do metilglioxal sobre a coordenação motora de camundongos. Em A e C os animais foram tratados com MGO (20, 80, 200 mg/kg, i. p.), e após 4 h, avaliados no teste do poste sobre o tempo de orientação para baixo (A) - t-turn (s) - e o tempo de descida (C) - t-descend (s); Em B e D os animais foram tratados com MGO (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) por 9 dias, e avaliados 24 h após a última administração, sobre B) t-turn (s) e D) t-descend (s). As barras representam a média \pm E. P. M. de 11-18 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças estatísticas (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

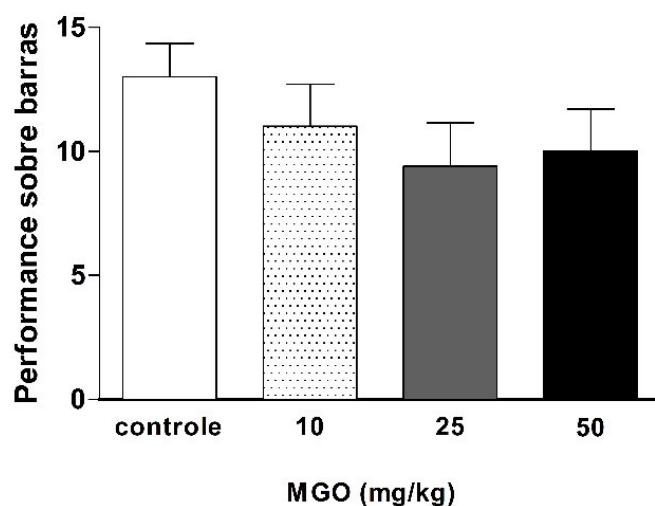


Figura 23. Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a força de camundongos. Os animais foram tratados por 7 dias, e avaliados 24 h após a última administração, sobre a performance no teste de barras horizontais (2, 4 e 6 mm). Não foram encontradas diferenças estatísticas. As barras representam a média ± E. P. M. de 12 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças estatísticas (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.1.4. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a interação social de camundongos

Após 10 dias de tratamento com MGO, os animais foram avaliados no teste de interação social, 24 h após a última administração. Neste paradigma, após um período de habituação sozinho de 5 min no aparato, o animal teste explorou dois compartimentos, um vazio e o outro com um animal desconhecido. O tempo de permanência em ambos os compartimentos foi registrado por 10 min. Todos os grupos testados permaneceram um tempo significativamente maior na câmara de interação, em comparação com o respectivo tempo gasto no compartimento vazio [$F_{(3,86)} = 0,1120$; $p > 0,05$] (Fig. 24A). Não foram observadas alterações significativas no número de entradas em ambas as câmaras para cada grupo, portanto o comportamento exploratório dos animais não foi alterado (Fig. 24B). Dessa forma, observa-se que o MGO, nas doses aqui testadas, não causou déficits no comportamento de interação social, uma vez que todos os grupos permaneceram um tempo médio maior no compartimento de interação, junto ao animal desconhecido, em relação ao compartimento vazio.

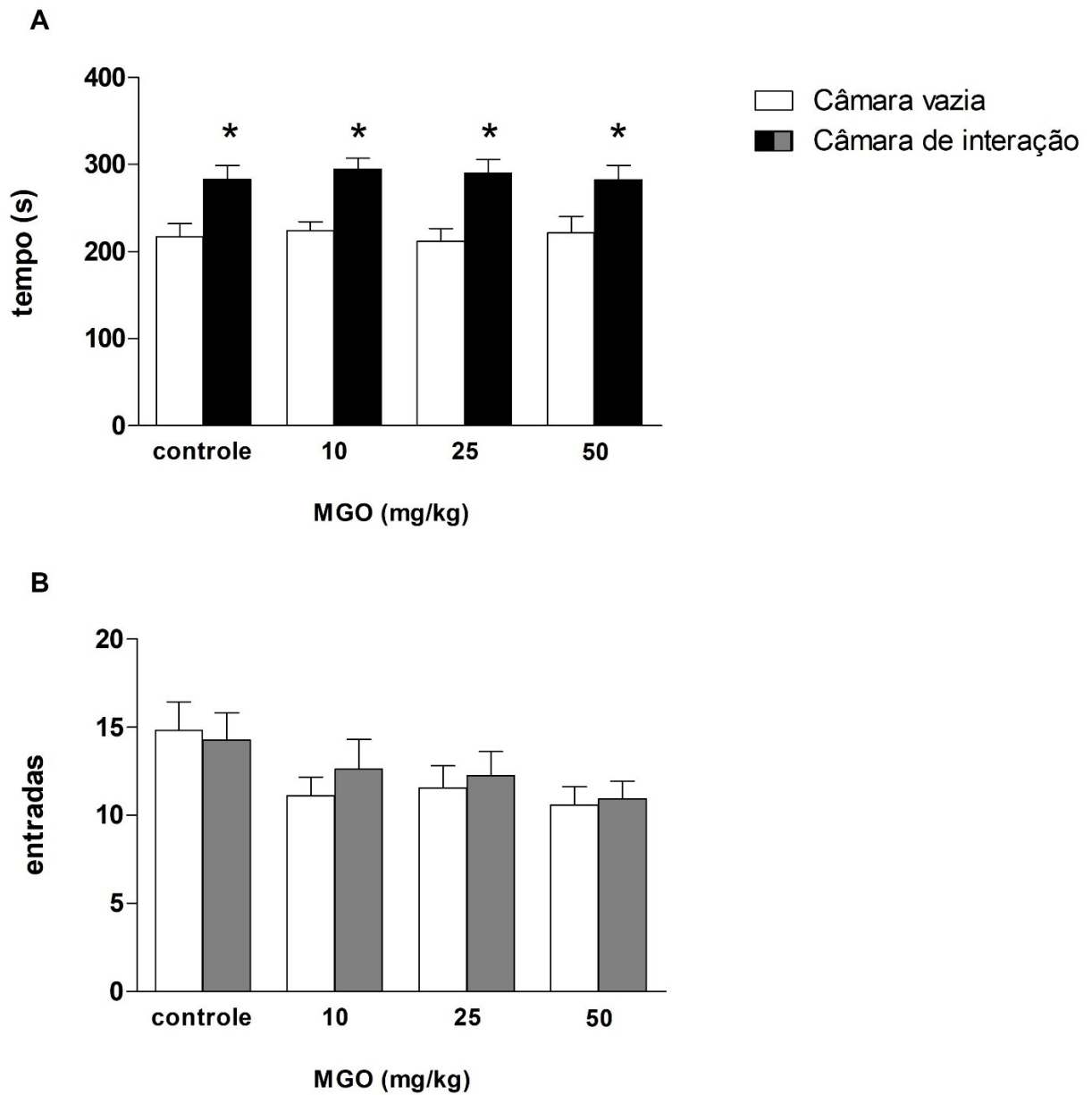


Figura 24. Efeitos do metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a interação social de camundongos. Os animais foram tratados por 10 dias, e avaliados 24 h após a última administração, sobre o A) tempo nas câmaras de interação e vazia; e sobre o B) número de entradas; na fase de sociabilidade (10 min) do teste de interação social. As barras representam a média \pm E. P. M. de 11-12 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.1.5. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre o comportamento tipo-depressivo de camundongos

A dose inicial de MGO 20 mg/kg também foi empregada para avaliar o comportamento tipo-depressivo nos animais. Assim, um grupo de animais foi tratado por 5 dias (administração única diária) com MGO e avaliado no sexto dia através do teste de suspensão pela cauda.

O experimento demonstrou que o MGO (20 mg/kg, i. p.) aumentou o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda [$t_{(14)}= 3.357$] (Fig. 25A). Isso revela um efeito tipo-depressivo do MGO. Nenhuma alteração na atividade locomotora espontânea desses camundongos foi detectada no teste do campo aberto realizado 2 h após o teste de suspensão pela cauda (Fig. 25B), indicando que as alterações observadas não foram afetadas devido a alguma mudança na atividade locomotora.

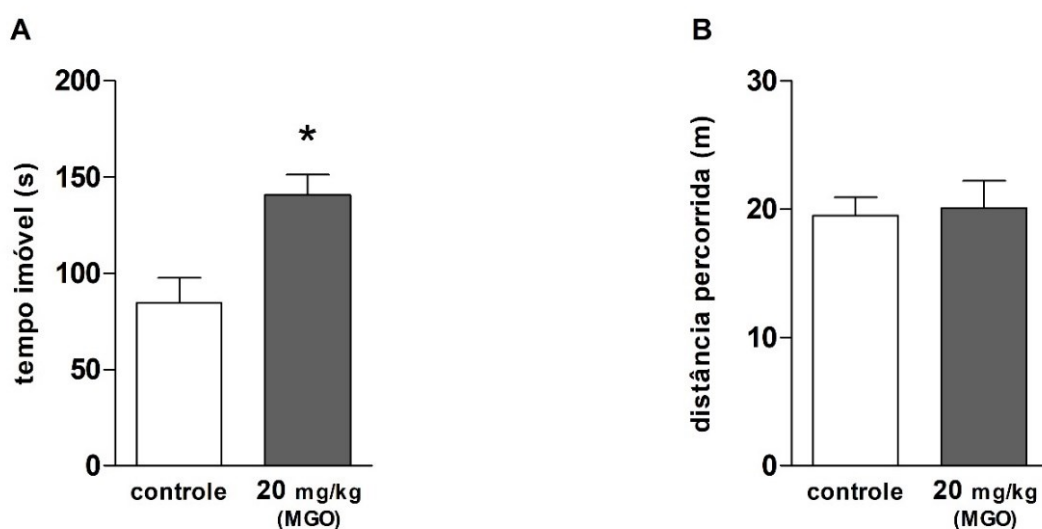


Figura 25. Efeitos do metilglioxal (20 mg/kg, i. p.) sobre o comportamento tipo-depressivo em camundongos. Os animais foram tratados por 5 dias, e avaliados 24 h após a última administração, sobre o A) tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda; e após 2 h, sobre a B) distância percorrida no teste do campo aberto. As barras representam a média \pm E. P. M. de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

6.1.6. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a memória espacial de curto prazo de camundongos

A memória espacial de curto prazo dos animais foi avaliada através do teste de realocação de objeto. Para esse teste, a dose de 20 mg/kg (i. p.) de MGO foi selecionada, por não apresentar alterações locomotoras no campo aberto após administração aguda. A sessão teste foi realizada 90 min após a sessão treino.

Portanto, inicialmente o teste de realocação de objeto foi conduzido após injeção única e sessão teste 3,6 h após a administração de MGO, ou repetido, em que os animais receberam 6 injeções diárias e a sessão teste foi realizada 24 h após a última administração de MGO. Em ambos os casos, foram utilizados grupos independentes de animais que participaram exclusivamente de apenas um teste, de modo a evitar interferências decorrentes de outros testes.

A exploração do objeto B (realocado) pelos animais controle foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos tratamentos agudo [$t_{(6)} = 2,590$] (Fig. 26A) ou repetido [$t_{(5)} = 2,808$] (Fig. 26B), indicando retenção de memória. No entanto, os animais tratados com MGO (20 mg/kg, i. p.) apresentaram déficits de memória, como mostrado pelo índice de localização do objeto realocado permanecendo em torno de 50% ($p < 0,05$). Este efeito foi observado de forma semelhante nos tratamentos agudo [$t_{(9)} = 0,011$] (Fig. 26A) e repetido [$t_{(7)} = 0,979$] (Fig. 26B). Nas sessões de habituação (5 min) em campo aberto, todos os grupos apresentaram médias de atividade locomotora que não diferiram do grupo controle. Nas sessões treino, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no tempo de exploração dos objetos, indicando que não houve nenhum viés devido à preferência exploratória de objetos (familiar e realocado) (Fig. 26C e D). Os resultados do teste de realocação de objeto sugerem que a administração de MGO causou um comprometimento da memória de curto prazo em camundongos.

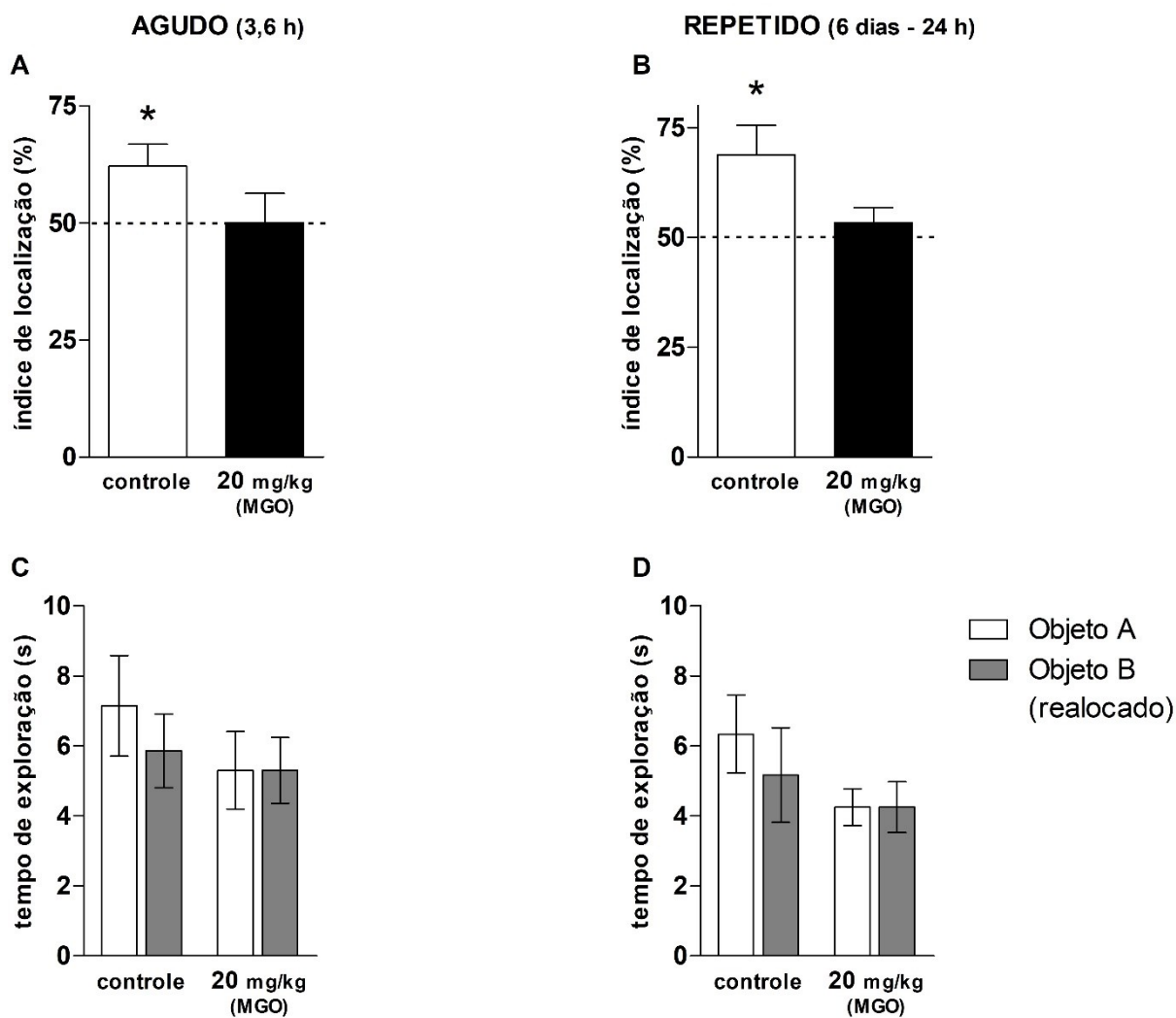


Figura 26. Efeitos do metilglioxal (20 mg/kg, i. p.) sobre a memória espacial de curto prazo (90 min) de camundongos, no teste de realocação de objeto. Em A) e C), os animais receberam uma única administração, e a sessão teste foi realizada após 3,6 h; Em B) e D), os animais foram tratados por 6 dias, e avaliados na sessão teste 24 h após a última administração. São apresentados os índices de localização (percentagem de tempo de exploração do objeto realocado em relação à exploração total) para os tratamentos agudo (A) e repetido (B). E na sessão treino, o tempo de exploração dos dois objetos idênticos foi avaliado para os tratamentos agudo (C) ou repetido (D). As barras representam a média \pm E. P. M. de 9-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com 50% (teste *t* de Student).

6.1.7. Efeitos do tratamento com metilglioal sobre a memória de longo prazo de camundongos

A memória espacial e a memória de reconhecimento de longo prazo (24 h) dos animais também foram avaliadas. Testando os efeitos de doses repetidas de MGO (10, 25, 50 mg/kg, i. p.), após 8 dias de tratamento, foram concluídos os testes de realocação de objeto (memória espacial) e de reconhecimento de objeto (memória de reconhecimento), com grupos independentes de animais.

No teste de realocação do objeto, o grupo controle [$t_{(10)}= 4,343$] e MGO (10 mg/kg, i. p.) [$t_{(10)}= 4,237$] apresentaram um índice de localização acima de 50% na exploração do objeto realocado ($p < 0,05$). Porém, quanto ao mesmo parâmetro, os animais tratados com 25 mg/kg [$t_{(11)}= 0,573$] ou 50 mg/kg [$t_{(11)}= 0,051$] de MGO não discriminaram entre o objeto na localização familiar e o objeto realocado, exibindo índices de localização similar a 50% ($p > 0,05$). Esta resposta indica comprometimento da memória espacial. No teste de realocação de objeto, os animais tratados não apresentaram alterações da atividade locomotora ou preferências de exploração entre os objetos na sessão treino (Fig. 27C).

No teste de reconhecimento do objeto (Fig. 27B), os animais controle apresentaram um índice de reconhecimento (relacionado à exploração de um novo objeto diferente em substituição a um familiar) significativamente maior que 50% [$t_{(11)}= 5,201$; $p < 0,05$], um indicativo de retenção de memória. Uma retenção de memória semelhante foi observada nos animais tratados com 10 mg/kg [$t_{(10)}= 11,35$; $p < 0,05$] e 25 mg/kg [$t_{(11)}= 3,645$; $p < 0,05$] de MGO. No entanto, os animais que receberam 50 mg/kg de MGO foram incapazes de distinguir entre os objetos novo e familiar, como mostrado pelo índice de reconhecimento do objeto novo semelhante a 50% ($p > 0,05$). A ausência de preferência pelo objeto novo indica prejuízo na memória de reconhecimento. Na sessão de treino do teste de reconhecimento de objeto, não houveram alterações na atividade locomotora ou na preferência de exploração entre os objetos (Fig. 27D).

Assim, conforme o observado, os resultados indicam que em doses mais altas, os animais tratados com MGO apresentam prejuízos na memória espacial e de reconhecimento de longo prazo.

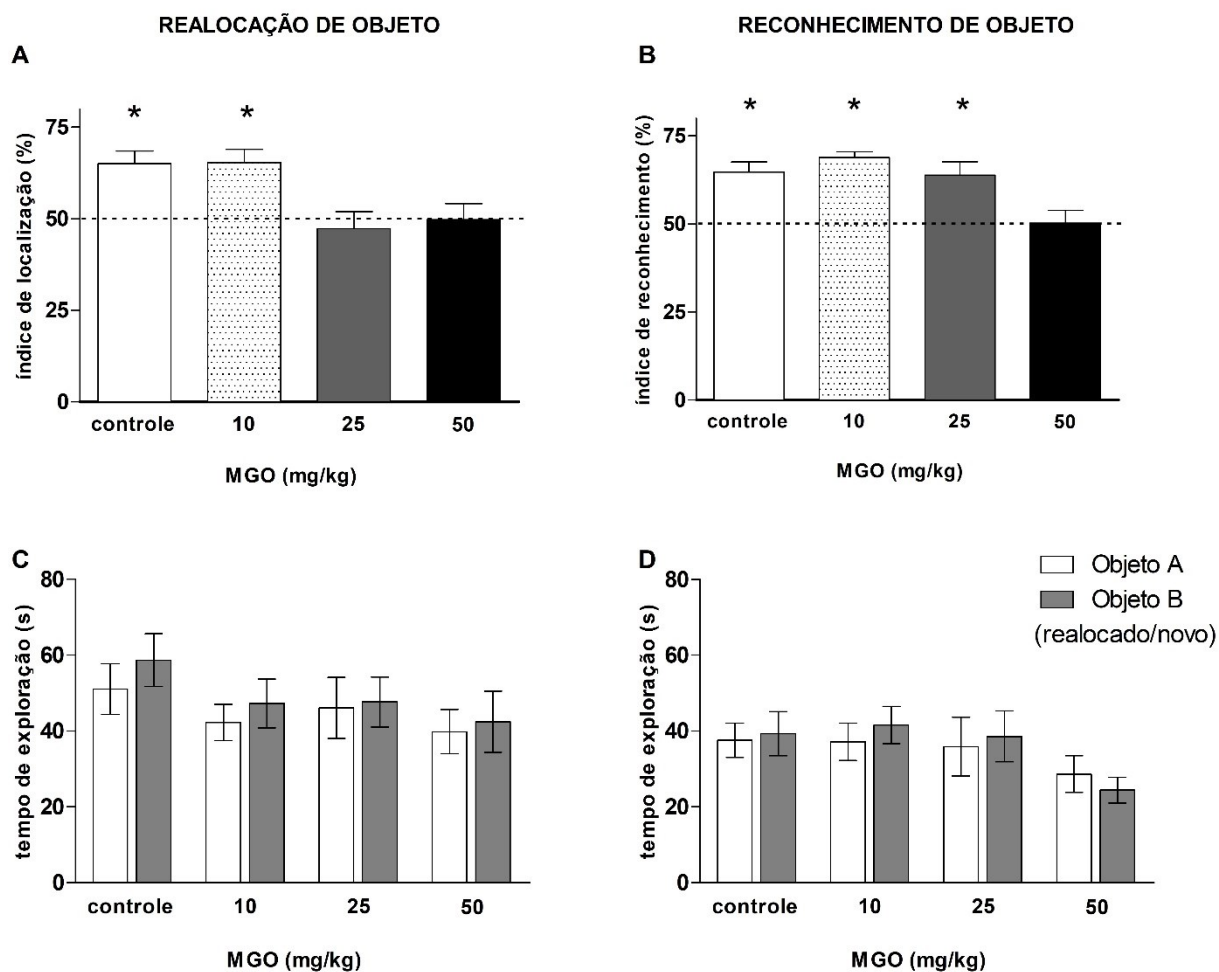


Figura 27. Efeitos do metilglioal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a memória espacial e de reconhecimento de longo prazo (24 h) de camundongos. Os animais foram tratados conforme a seguinte ordem: pré-tratamento (dias 1 - 4); sessão de habituação de 5 min (dias 5, 6 e 7); sessão treino de 10 min (dia 8); e sessão teste (dia 9), 24 h após a última administração. Grupos independentes de animais participaram do teste de realocação de objeto (A) ou de reconhecimento de objeto (B). São apresentados o índice de localização (%) na sessão teste do teste de realocação de objeto; B) O índice de reconhecimento (%) na sessão teste do teste de reconhecimento de objeto; O tempo (s) de exploração dos dois objetos na sessão treino do teste de realocação de objeto (C) ou na sessão treino do teste de reconhecimento de objeto (D). As barras representam a média \pm E. P. M. de 11-12 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com 50% indicado pelas linhas tracejadas (teste t de Student).

6.1.8. Efeitos do tratamento com metilglioal sobre a memória de trabalho de camundongos

A avaliação da memória de trabalho dos animais foi realizada através da taxa de alternâncias espontâneas no labirinto em Y. Os animais foram tratados com MGO (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) por 6 dias e o teste realizado 24 h após a última administração. A taxa de alternâncias dos animais tratados com 10 ou 25 mg/kg de MGO não apresentaram diferenças, quando comparados com o grupo controle. No entanto, a taxa de alternâncias foi significativamente diminuída nos animais tratados com 50 mg/kg de MGO [$F_{(3,38)} = 4,3597$; $p < 0,05$], quando comparados com o grupo controle (Fig. 28A). Isso indica déficit da memória de trabalho. Não foram observadas diferenças significativas no número total de entradas [$F_{(3,38)} = 1,346$; $p > 0,05$] (Fig. 28B). Esse resultado indica que a locomoção não foi alterada, o que valida a mensuração de alternâncias espontâneas.

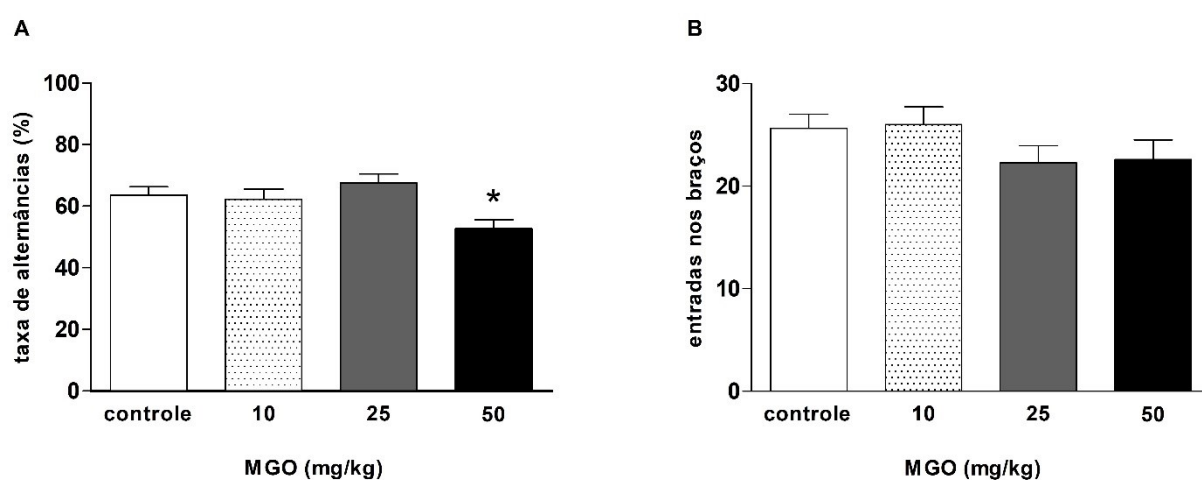


Figura 28. Efeitos do metilglioal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a memória de trabalho de camundongos. Os animais foram tratados por 6 dias, e avaliados 24 h após a última administração. São apresentados A) taxa de alternâncias (%) e o B) número de entradas nos braços do labirinto em Y. As barras representam a média \pm E. P. M. de 10-11 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.1.9. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre a memória aversiva de camundongos

O teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down* foi utilizado para a avaliação da memória aversiva de curto (1,5 h) e longo (24 h) prazos. No tratamento agudo (Fig. 29A), a sessão treino foi realizada 2 h após a administração de MGO (20 mg/kg, i. p.), seguida pela sessão teste de curto prazo que foi realizada 90 min após o treino e 3,5 h após a administração de MGO. O teste de longo prazo foi realizado 24 h após o término da sessão teste de curto prazo. Tanto o grupo controle quanto o tratado apresentaram retenção de memória de curto e longo prazos, como observado por um tempo de latência de descida da plataforma maior, em comparação com o tempo de descida na sessão treino ($p < 0,05$) (Fig. 29A).

No entanto, no tratamento repetido com MGO (10, 25, 50 mg/kg, i. p.), os animais foram tratados por 9 e 10 dias com metilglioxal, 24 h antes do início das sessões teste, e foram observados déficits. A análise estatística de Kruskal-Wallis seguido da comparação de Dunn revelou que, quando comparado com a latência na sessão treino, o grupo controle apresentou latências significativamente maiores em 1,5 h e 24 h, tempos que avaliam as memórias de curto e longo prazos, respectivamente ($p < 0,05$). E todos os grupos tratados com MGO apresentaram déficits de memória de curto prazo (Fig. 29B), e déficits em relação a memória de longo prazo com as doses de 10 e 50 mg/kg ($p > 0,05$) (Fig. 29B).

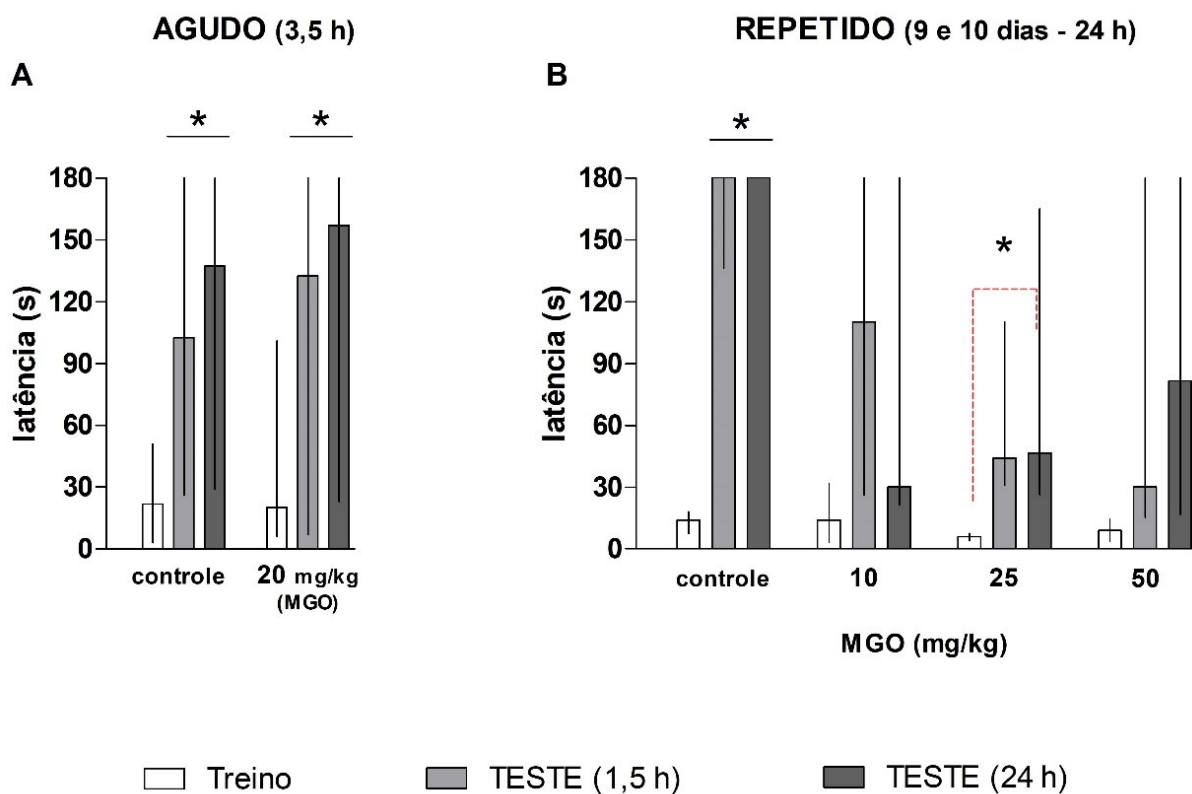


Figura 29. Efeitos do metilglioxal sobre a memória aversiva de camundongos. Os animais foram tratados A) uma vez com metilglioxal (20 mg/kg, i. p.) 3,5 h antes do início das sessões teste ou B) por 9 e 10 dias com metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) 24 h antes do início das sessões teste. A memória de curto prazo (1,5 h) e longo prazo (24 h) foram avaliadas com base na latência de descida da plataforma (s) nas sessões do teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*. As barras representam a mediana com amplitude interquartil de 9-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado à sessão treino do mesmo grupo (teste de Kruskal-Wallis seguido de comparação de Dunn).

6.2. PARTE 2: Avaliação bioquímica

Ao final dos tratamentos repetidos de 11 dias consecutivos com MGO (10, 25, 50 mg/kg, i. p.), no dia 12, após 24 h da última administração, os animais foram eutanasiados e imediatamente foram coletados o plasma e as estruturas encefálicas (hipocampo e córtex pré-frontal) para que se efetuasse a avaliação bioquímica. Os tecidos utilizados para as análises bioquímicas foram provenientes dos animais que participaram tanto da bateria comportamental A, quanto dos animais que participaram da bateria B (Fig. 9) da FASE II: Protocolo repetido (p. 33).

6.2.1. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre seus níveis plasmáticos em camundongos

Os níveis de MGO foram determinados no plasma pela técnica de HPLC com detector de fluorescência. As amostras de sangue foram coletadas 24 h após 11 administrações diárias de MGO (10, 25, 50 mg/kg, i. p.). Os níveis plasmáticos de MGO ficaram em média 0,131 μ M. Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de MGO entre os grupos controle e tratado, conforme revelado pelo teste ANOVA de uma via [$F_{(3,25)} = 1,292$; $p > 0,05$] (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis de metilglioxal (MGO) no plasma 24 h após a última injeção.

Tratamento	MGO (μ M)
Controle	0.129 \pm 0.016
MGO 10 mg/kg	0.134 \pm 0.026
MGO 25 mg/kg	0.103 \pm 0.018
MGO 50 mg/kg	0.158 \pm 0.019

Os dados estão apresentados como média \pm E. P. M. de 7-8 animais por grupo.

6.2.2. Efeitos do tratamento com metilglioal sobre os níveis proteicos do sistema das glioalases no sistema nervoso central de camundongos

Foram também avaliados por Western blotting os níveis proteicos de Glo1 e Glo2, enzimas de detoxificação do MGO. Os níveis de Glo1 diminuíram 17% no hipocampo após tratamento com 10 mg/kg de MGO, em comparação ao grupo controle [$F_{(3,36)} = 1,815$; $p < 0,05$] (Fig. 30A). No córtex pré-frontal, foi observado uma diminuição de 27% na quantidade relativa de Glo1 em animais tratados com MGO (50 mg/kg, i. p.), em comparação com o grupo controle [$F_{(3,39)} = 4,037$; $p < 0,05$] (Fig. 30B). Não foram observadas outras alterações nos níveis de Glo1. Os níveis de Glo2 não foram alterados pelo tratamento com MGO, tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal dos animais (Fig. 30C, D).

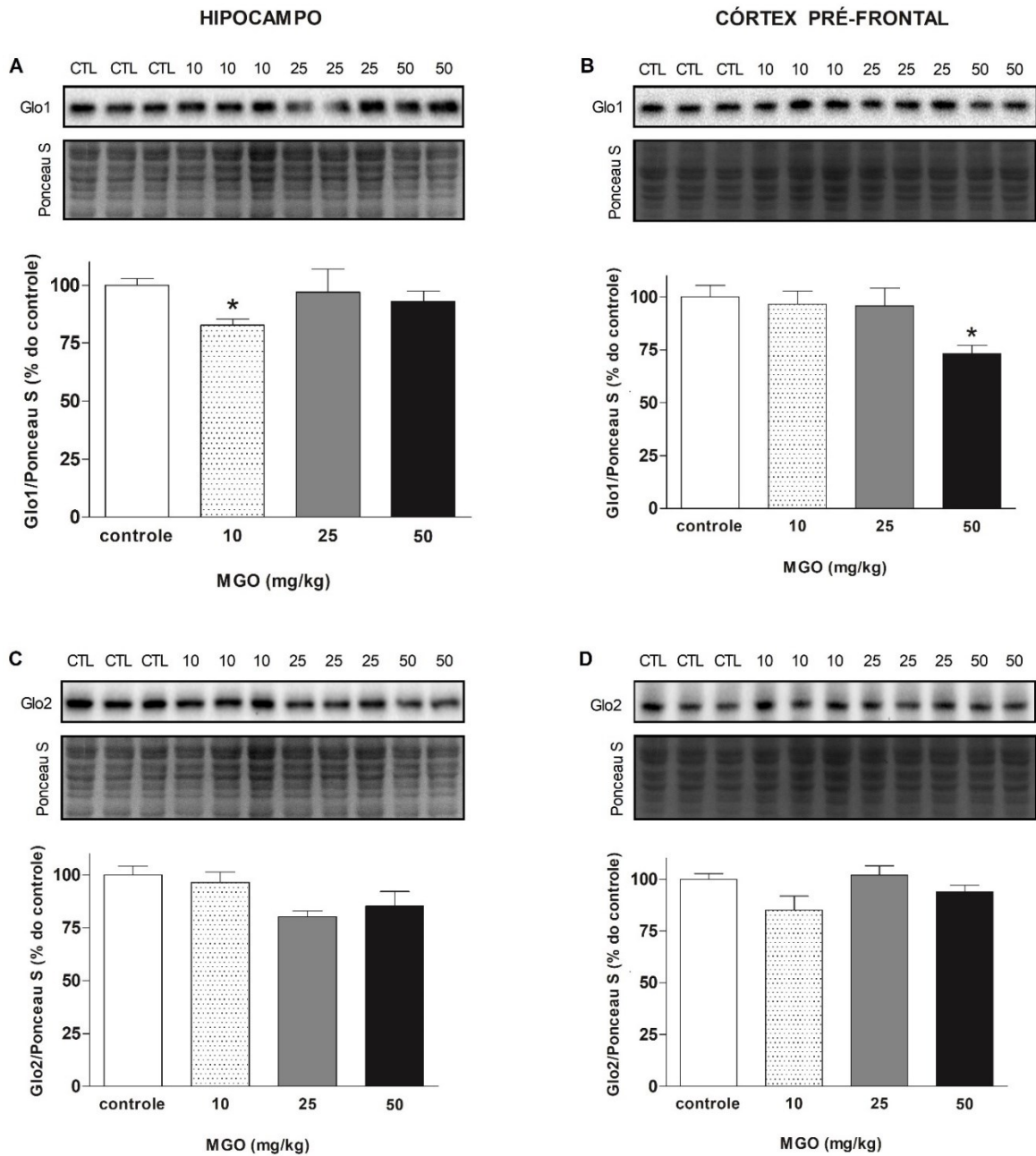


Figura 30. Efeitos do tratamento com metilglioxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre os níveis proteicos da glicoxalase 1 (Glo1) e glicoxalase 2 (Glo2). Os camundongos foram tratados por 11 dias e as amostras coletadas 24 h após a última administração. Os níveis proteicos foram relativizados pela quantidade de proteína, a qual foi avaliada pela intensidade do corante Ponceau S. Imagens representativas e suas respectivas quantificações são apresentadas para Glo1 (A) e Glo2 (C) no hipocampo e para Glo1 (B) e Glo2 (D) no córtex pré-frontal. As barras representam a média \pm E. P. M. ($n = 8-15$ animais por grupo). CTL: animais controle. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.2.3. Efeitos do tratamento com metilgloxal sobre a atividade enzimática da glioalase 1 no córtex pré-frontal de camundongos

Uma vez que, após o tratamento com MGO, o córtex pré-frontal dos animais apresentou redução nos níveis de Glo1 (50 mg/kg, i. p.), foi realizado ensaio enzimático para estimar a atividade da Glo1 no córtex pré-frontal dos animais tratados com MGO por 11 dias. Os resultados mostraram que a atividade enzimática média da Glo1 ficou em 368 nmol/mg/min. No entanto não foram reveladas diferenças significativas entre os grupos tratados com MGO em comparação ao controle (Fig. 31).

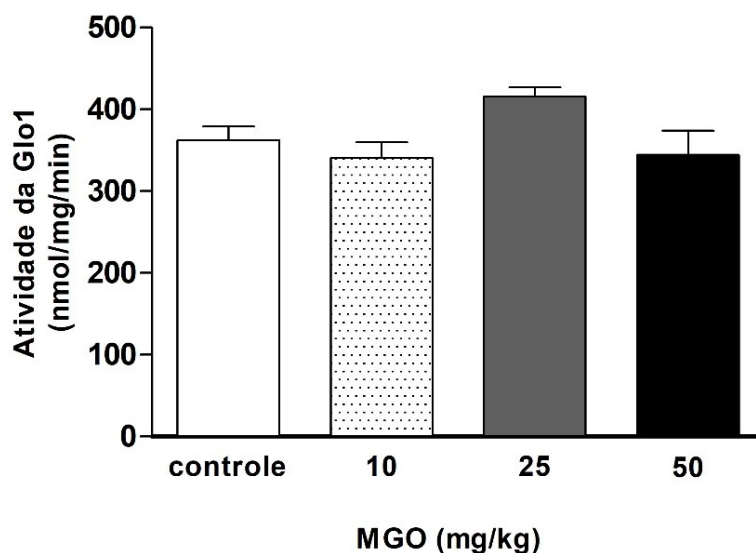


Figura 31. Efeitos do metilgloxal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre a atividade enzimática da glioalase 1 (Glo1) no córtex pré-frontal de camundongos. Os animais foram tratados por 11 dias e as amostras coletadas 24 h após a última administração. As barras representam a média \pm E. P. M. (n = 5-6). Não foram encontradas diferenças estatísticas (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.2.4. Efeitos do tratamento com metilglioxal sobre parâmetros de dano oxidativo celular no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos

Após o tratamento repetido, os danos oxidativos foram avaliados no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais. Assim, através da técnica de dot blot, foram quantificados os níveis de adutos proteicos de 4-hidroxinonal (4-HNE) e malondialdeído (MDA), os quais podem ser gerados após processos de peroxidação lipídica celular. Conforme a Tabela 3 abaixo, não foram detectadas alterações significativas nestes dois marcadores de dano oxidativo.

Tabela 3. Efeitos do metilglioxal (MGO) sobre os níveis de 4-hidroxinonal (4-HNE) e malondialdeído (MDA) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos após 11 dias de tratamento repetido.

Variável	MGO (mg/kg)			
	Controle	10	25	50
4-HNE				
<i>Hipocampo</i>	100.0 ± 11.88	77.57 ± 13.42	100.7 ± 20.32	72.88 ± 13.96
<i>Córtex pré-frontal</i>	100.0 ± 31.81	157.5 ± 23.82	99.58 ± 25.36	102.0 ± 22.32
MDA				
<i>Hipocampo</i>	100.0 ± 15.29	106.4 ± 8.780	97.08 ± 13.29	85.12 ± 12.18
<i>Córtex pré-frontal</i>	100.0 ± 14.03	133.1 ± 17.72	128.3 ± 20.50	101.7 ± 20.18

Os dados estão apresentados como média ± E. P. M. da porcentagem (%) do grupo controle. Grupos de 6-8 animais.

6.2.5. Efeitos do tratamento com metilglioal sobre os níveis de monoaminas no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos

Os níveis de monoaminas (DA, NA e 5-HT) foram avaliados no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais pela técnica de HPLC, baseado em suas autofluorescências. Vinte e quatro horas após 11 injeções diárias de MGO (10, 25 e 50 mg/kg, i. p.), os níveis de NA não foram alterados pelo tratamento com MGO tanto no córtex pré-frontal (Fig. 32A) como hipocampo (Fig. 32B). Também não foram encontradas diferenças nos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal (Fig. 32C) como hipocampo (Fig. 32D). Entretanto, no córtex pré-frontal o tratamento com MGO reduziu os níveis de DA dos animais tratados com 50 mg/kg [$F_{(3,27)}=4,828$; $p < 0,05$], mas não nas doses de 10 e 25 mg/kg (Fig. 32E). Os níveis de DA no hipocampo ficaram abaixo do nível limite de detecção.

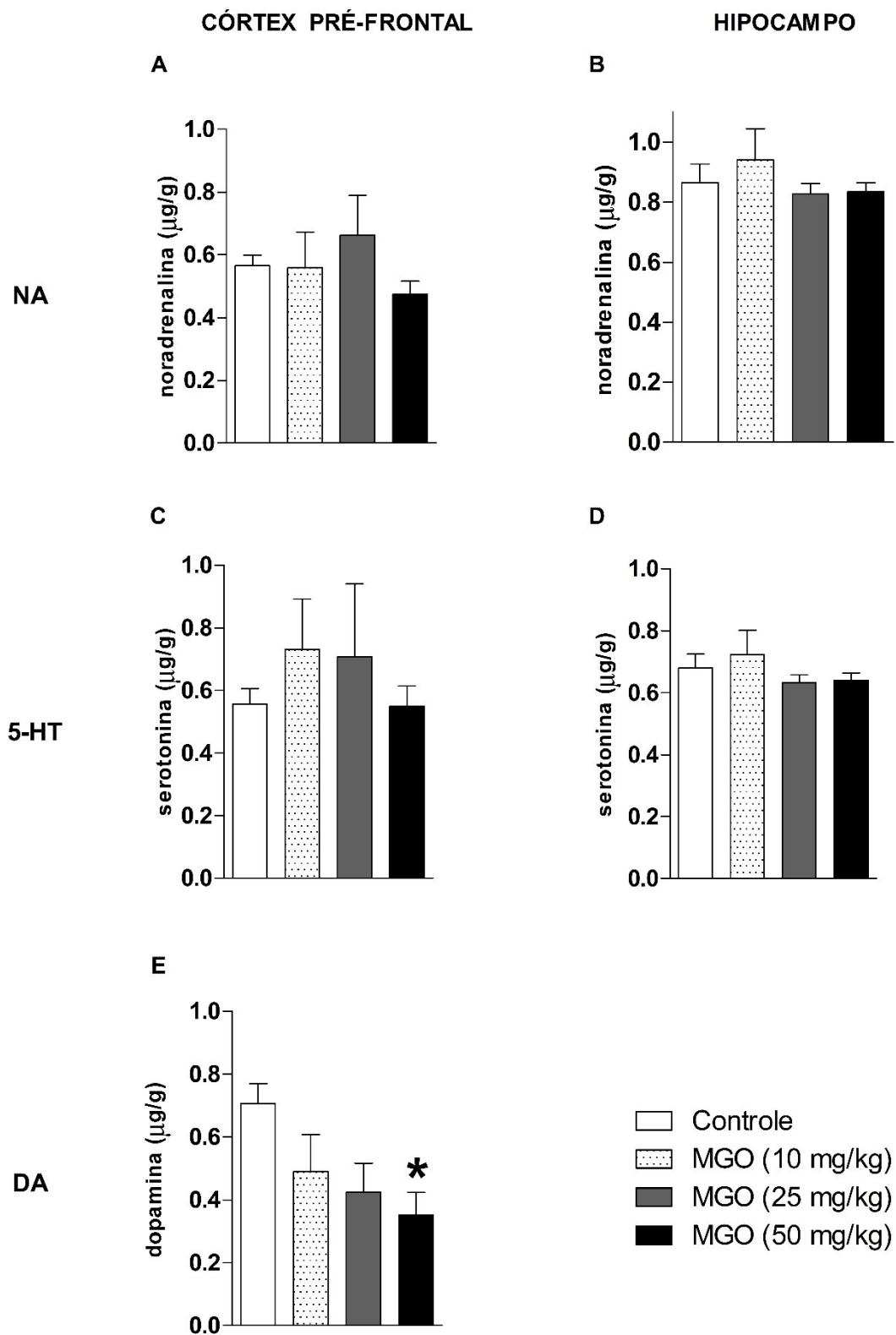


Figura 32. Efeitos do metilglioal (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) sobre os níveis de monoaminas. Os camundongos foram tratados por 11 dias e as amostras coletadas 24 h após a última administração. Noradrenalina (NA: A e B), serotonina (5-HT: C e D) e dopamina (DA: E) foram determinadas por HPLC no córtex pré-frontal (A, C e E) e no hipocampo (B, D). As barras representam a média \pm E. P. M. (n = 6-11). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.3. PARTE 3: Avaliação comportamental II

Após uma caracterização comportamental e bioquímica dos efeitos do MGO, utilizando diferentes doses e testando regimes agudos e repetidos, o objetivo da Parte 3 foi investigar os seus efeitos através da modulação de diferentes sistemas.

Assim, o tratamento repetido por 11 dias com MGO foi empregado de forma concomitante com outros fármacos e substâncias, de modo a tentar impedir os seus efeitos deletérios previamente encontrados nos animais. Foram utilizados os fármacos: bupropiona, inibidor da recaptação de DA e NA; cetamina, antagonista de receptores do tipo N-metil-D aspartato (NMDAR); muscimol, agonista de receptores GABA do tipo A; e bicuculina, antagonista de receptores GABA do tipo A.

Além disso, o MGO é um dos principais agentes de glicação e formação de AGEs, e estes, por sua vez, podem ativar o RAGE (THORNALLEY & RABBANI, 2011; XUE et al., 2014). Portanto, foi investigado o papel dos AGEs sobre os efeitos do tratamento com MGO. Para tanto, o MGO foi tratado repetidamente em conjunto com o FPS-ZM1, um antagonista específico do RAGE que é capaz de atravessar a BHE (DEANE et al., 2012).

Nesta fase, os testes comportamentais se concentraram em investigar os efeitos dos tratamentos sobre a memória e a função locomotora. A dose de MGO de 50 mg/kg foi selecionada para os tratamentos. Esta escolha se deu por esta dose ser a mais efetiva em alterar o comportamento dos camundongos, conforme apresentado nos experimentos anteriores (Parte 1).

6.3.1. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina

Primeiramente, os efeitos comportamentais do tratamento repetido (11 dias) foram investigados através de baterias de testes para a avaliação da atividade locomotora espontânea e das memórias de trabalho e espacial. Os animais foram tratados somente com MGO (50 mg/kg, i. p.); ou com a combinação de MGO e: a) bupropiona (10 mg/kg, v. o.); b) cetamina (1 mg/kg, i. p.); c) muscimol (0,5 mg/kg, i. p.); e d) bicuculina (2 mg/kg, i. p.). A Figura 33 abaixo apresenta o esquema de tratamento e os experimentos realizados.

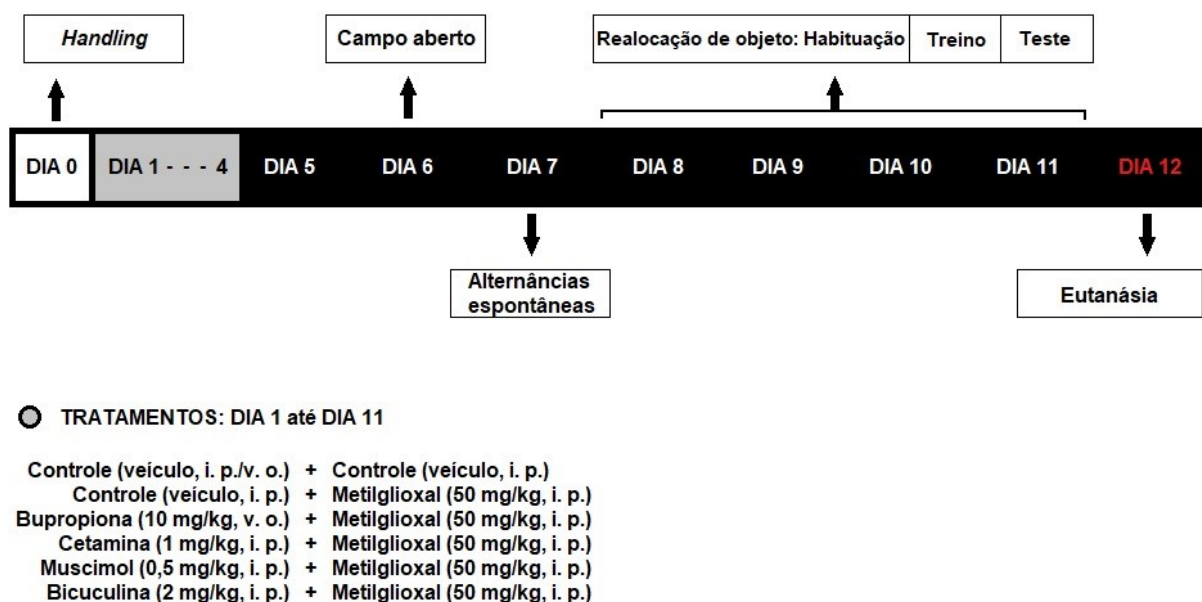


Figura 33. Escala temporal dos testes comportamentais de cotratamentos repetidos em camundongos. As drogas bupropiona (10 mg/kg, v. o.), cetamina (1 mg/kg, i. p.), muscimol (0,5 mg/kg, i. p.), bicuculina (2 mg/kg, i. p.) ou salina (0,9%) foram administradas 30 min antes do metilglioxal (50 mg/kg, i. p.), uma vez ao dia, durante 11 dias.

6.3.1.1. Efeitos do tratamento repetido com metilglioal juntamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina sobre a atividade locomotora de camundongos

No sexto dia de tratamento repetido os animais foram avaliados no campo aberto. Utilizando os resultados obtidos com o software de rastreamento ANY-maze®, não foram reveladas alterações locomotoras nos diferentes parâmetros analisados entre os grupos, tais como distância total percorrida (Fig. 34), velocidade média, número de entradas e tempo gasto na área central ou tempo total de imobilidade durante o teste (dados não mostrados).

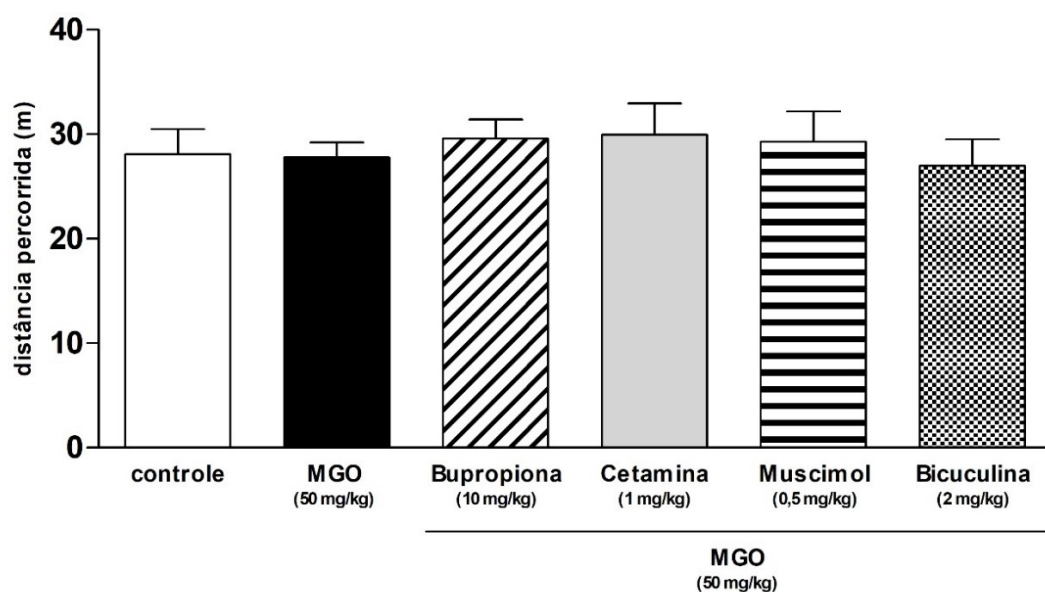


Figura 34. Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioal sobre a atividade locomotora de camundongos. Os animais foram tratados por 5 dias com metilglioal (50 mg/kg, i. p.) ou em cotratamento com bupropiona (10 mg/kg, v. o.), cetamina (1 mg/kg, i. p.), muscimol (0,5 mg/kg, i. p.) ou bicuculina (2 mg/kg, i. p.) e avaliados 24 h após a última administração. É mostrada a distância percorrida (m) durante 5 min no campo aberto. As barras representam a média \pm E. P. M. de 8-10 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças estatísticas (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.3.1.2. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina sobre a memória de longo prazo de camundongos

A memória espacial de longo prazo foi avaliada no dia 11, através do teste de realocação de objeto (Fig. 35A). A sessão treino foi realizada 24 h antes da sessão teste. Os grupos não apresentaram preferência de exploração dos objetos na sessão treino (Fig. 35B). Porém, na sessão teste, apenas o grupo controle apresentou um índice de exploração do objeto realocado maior que 50% [$t_{(9)} = 4,122$; $p < 0,05$], demonstrando retenção de memória. Confirmando-se resultados anteriores, os animais tratados com MGO (50 mg/kg, i. p.) apresentaram comprometimento de memória. Nenhuma das drogas administradas em cotratamento foi capaz de evitar os efeitos do MGO, sendo que os animais tratados com bupropiona, cetamina, muscimol e bicuculina apresentaram o mesmo prejuízo na discriminação entre os objetos familiar e realocado.

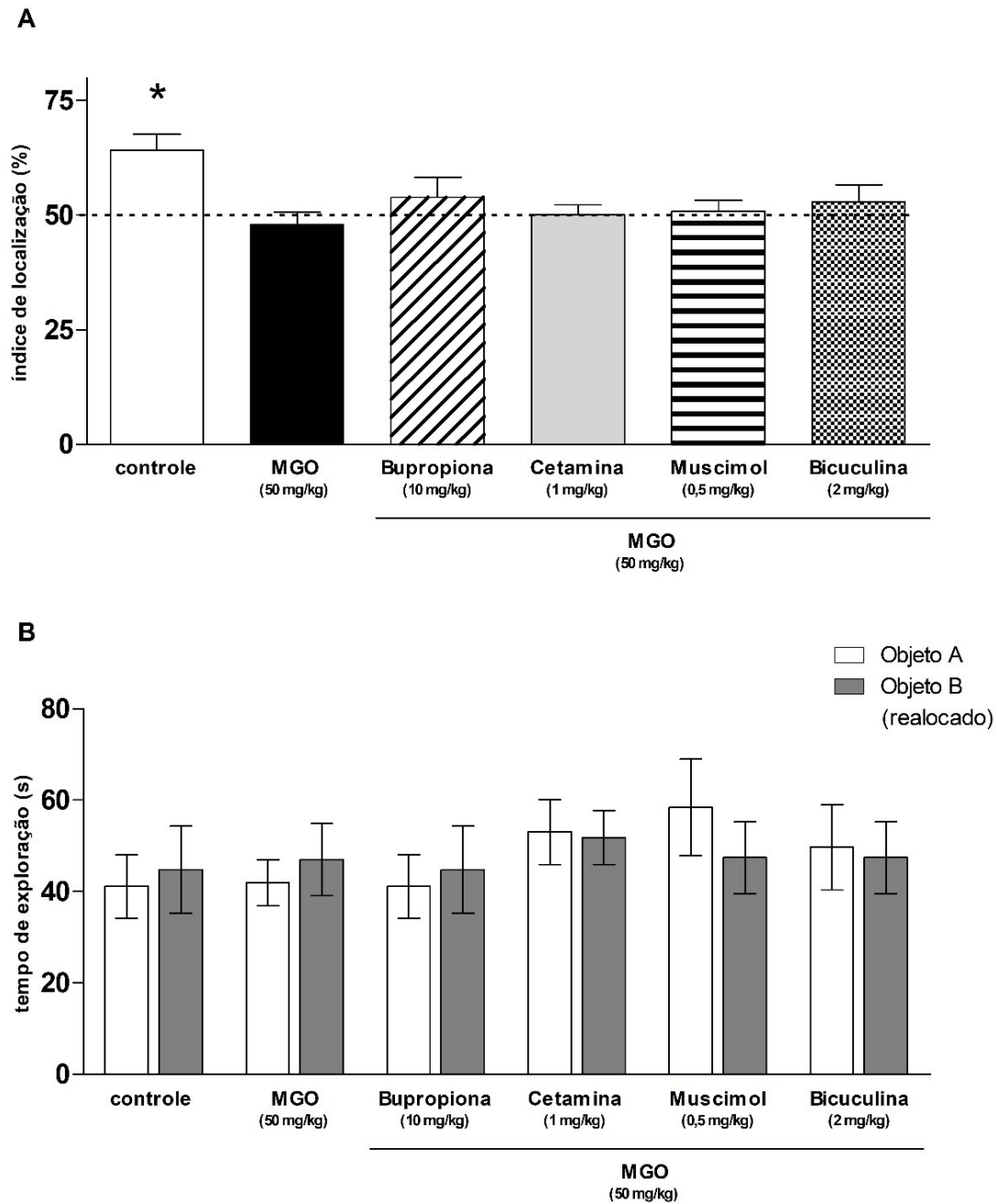


Figura 35. Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioal sobre a memória espacial de longo prazo (24 h) de camundongos. Os animais foram tratados por 10 dias com metilglioal (50 mg/kg, i. p.) ou em cotratamento com bupropiona (10 mg/kg, v. o.), cetamina (1 mg/kg, i. p.), muscimol (0,5 mg/kg, i. p.) ou bicuculina (2 mg/kg, i. p.) e avaliados na sessão teste do teste de realocação de objetos 24 h após a sessão treino e 20 h após a última administração. São mostradas o A) índice de localização (%) do objeto realocado na sessão teste e o B) tempo (s) de exploração dos dois objetos idênticos na sessão treino. As barras representam a média \pm E. P. M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com 50% indicado pelas linhas tracejadas (teste *t* de Student).

6.3.1.3. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina sobre a memória de trabalho de camundongos

Como observado em dados anteriores, o MGO (50 mg/kg) reduziu significativamente a taxa de alternâncias dos animais no labirinto em Y [$F_{(2,27)} = 3,8574$; $p < 0,05$] (Fig. 36A). Os grupos que foram tratados com MGO em cotratamento com bupropiona, cetamina ou muscimol não demonstraram diminuição da performance da memória de trabalho, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, quando as médias destes grupos foram comparadas com o grupo que recebeu somente MGO, também não foram reveladas diferenças estatísticas. Desta forma, a eficácia destes tratamentos em prevenir os efeitos do MGO ainda precisa ser confirmada por experimentos adicionais.

Os animais tratados com MGO em cotratamento com bicuculina apresentaram uma taxa de alternâncias média significativamente menor, em comparação com o controle, evidenciando assim déficit de memória de trabalho [$F_{(2,27)} = 4,7085$; $p < 0,05$] (Fig. 36A). Este dado indica claramente que a bicuculina não foi capaz de prevenir os déficits induzidos pelo MGO sobre a memória de trabalho.

Não houveram diferenças significativas no número total de entradas no labirinto em Y (Fig. 36B), confirmando assim, a validade do teste.

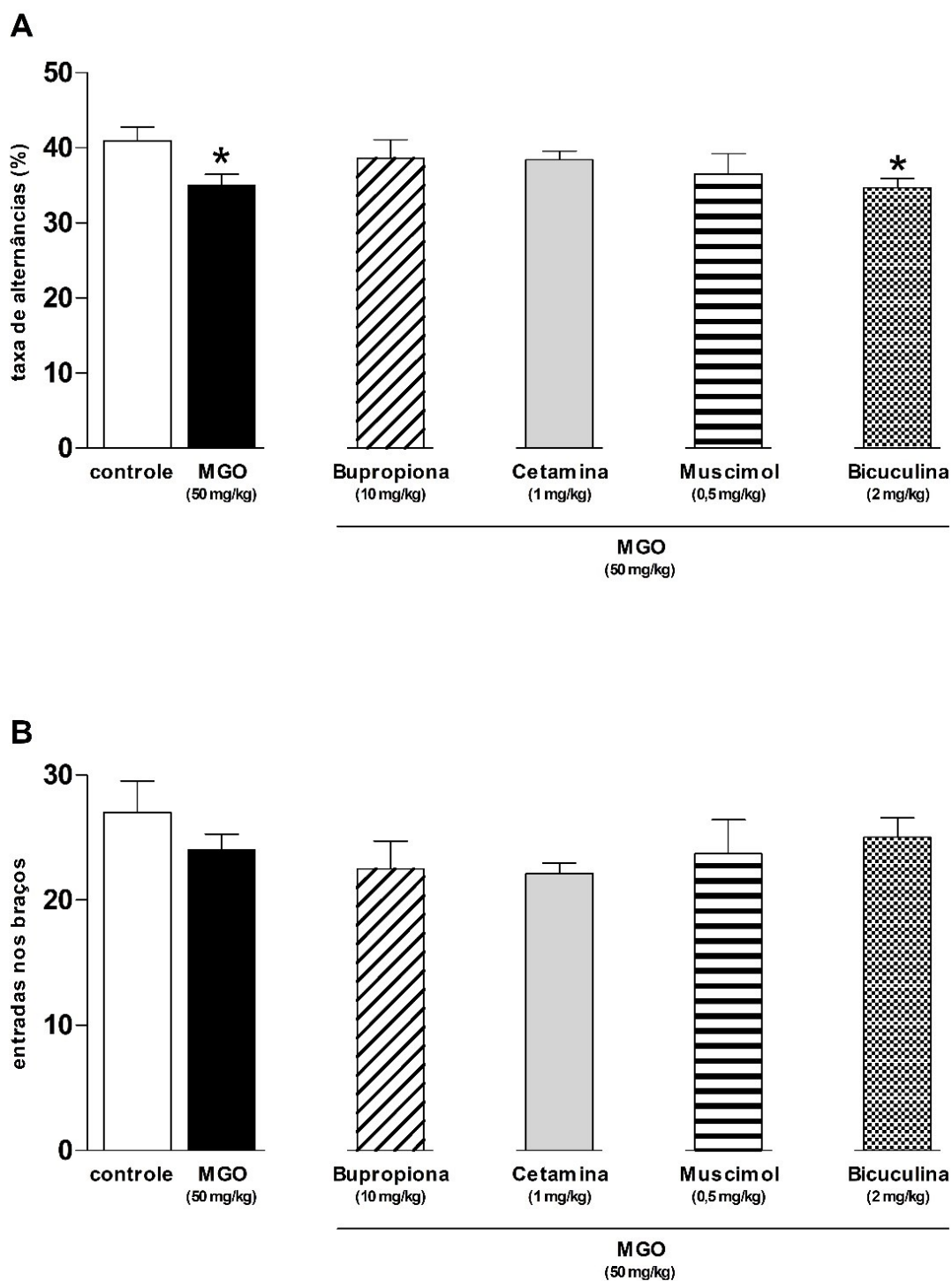


Figura 36. Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal sobre a memória de trabalho de camundongos. Os animais foram tratados por 6 dias com metilglioxal (50 mg/kg, i. p.) ou em cotratamento com bupropiona (10 mg/kg, v. o.), cetamina (1 mg/kg, i. p.), muscimol (0,5 mg/kg, i. p.) ou bicuculina (2 mg/kg, i. p.) e avaliados 24 h após a última administração. Foram registradas a A) taxa de alternâncias (%) e o B) número de entradas nos braços do labirinto em Y. As barras representam a média \pm E. P. M. de 10 animais por grupo. Os grupos foram comparados entre si e comparados entre controle e MGO (50 mg/kg). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste *t* de Student; e teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.3.2. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal juntamente com FPS-ZM1, um antagonista do RAGE

Os efeitos do ZM1, um antagonista do receptor de AGEs (RAGE), foram avaliados em animais tratados com MGO. Assim, foram realizados novos tratamentos de 11 dias com MGO (50 mg/kg, i. p.) e ZM1 (2 mg/kg, i. p.), ou com o cotratamento de ZM1 e MGO. Uma nova bateria de testes comportamentais foi realizada para a avaliação da atividade locomotora e das memórias espacial, de trabalho e aversiva (Fig. 37).



● TRATAMENTOS: DIA 1 até DIA 11

- Controle (veículo, i. p.) + Controle (veículo, i. p.)
- Controle (veículo, i. p.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)
- FPS-ZM1 (2 mg/kg, i. p.) + Controle (veículo, i. p.)
- FPS-ZM1 (2 mg/kg, i. p.) + Metilglioxal (50 mg/kg, i. p.)

Figura 37. Escala temporal dos testes comportamentais de cotratamentos repetidos com FPS-ZM1 e metilglioxal em camundongos. O FPS-ZM1 (2 mg/kg, i. p.) foi administrado 30 min antes do metilglioxal (50 mg/kg, i. p.), uma vez ao dia, durante 11 dias.

6.3.2.1. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a atividade locomotora de camundongos

Os animais foram submetidos ao campo aberto no quinto dia de tratamento repetido. Foram avaliados a distância percorrida (Fig. 38A), a velocidade média (Fig. 38B), e o número de entradas (Fig. 38C) e o tempo gasto (Fig. 38D) na área central. Os resultados demonstraram que os grupos MGO (50 mg/kg) e ZM1 (2 mg/kg), assim como MGO em cotratamento com ZM1, não apresentaram diferenças significativas entre si, ou em comparação com o controle.

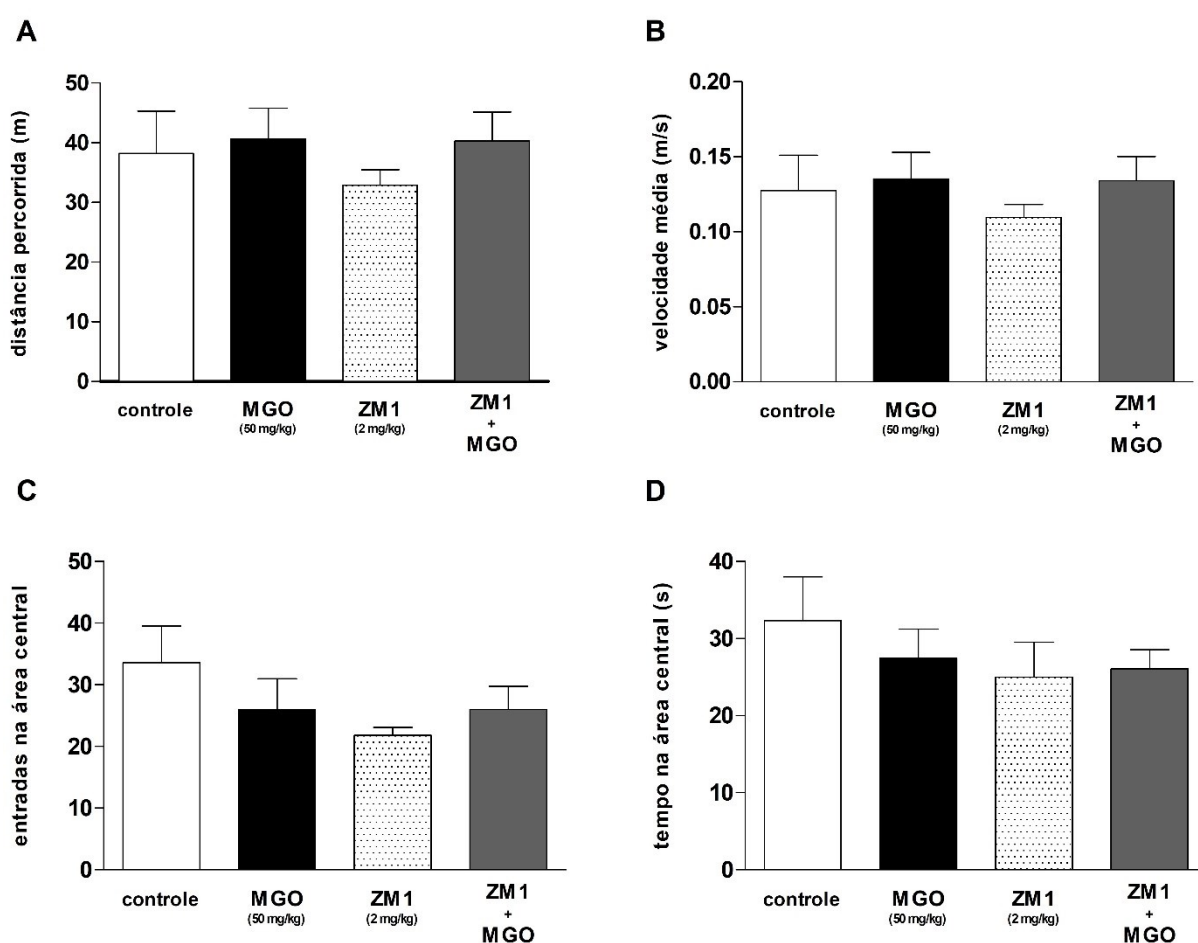


Figura 38. Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a atividade locomotora de camundongos. Os animais foram tratados por 4 dias com metilglioxal (MGO - 50 mg/kg, i. p.) ou FPS-ZM1 (ZM1 - 2 mg/kg, i. p.) ou em conjunto (ZM1 + MGO) e avaliados 24 h após a última administração. São mostrados a A) distância percorrida (m); B) velocidade média (m/min); C) número de entradas e D) tempo gasto (s) na área central durante 5 min no campo aberto. As barras representam a média \pm E. P. M. de 6-7 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças estatísticas (teste *post hoc* de Newman-Keuls).

6.3.2.2. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória espacial de longo prazo de camundongos

A memória espacial de longo prazo foi avaliada no teste de realocação de objeto. Os grupos controle [$t_{(6)} = 5,173$, $p < 0,05$] e ZM1 [$t_{(6)} = 14,57$, $p < 0,05$] exploraram o objeto B realocado por mais de 50% do tempo de exploração total, demonstrando retenção de memória (Fig. 39A). Os animais tratados com MGO não apresentaram diferenças no índice de localização dos objetos realocados [$t_{(6)} = 0,826$; $p > 0,05$], quando comparados com 50%, que corresponde a chance de exploração dada pelo acaso. Estes dados demonstram prejuízos da memória espacial de longo prazo. O ZM1 não foi capaz de impedir os efeitos deletérios do MGO sobre a memória espacial [MGO + ZM1: $t_{(6)} = 1,059$; $p > 0,05$]. Na sessão treino, para cada grupo não foram encontradas diferenças estatísticas entre a exploração dos objetos idênticos A e B (Fig. 39B).

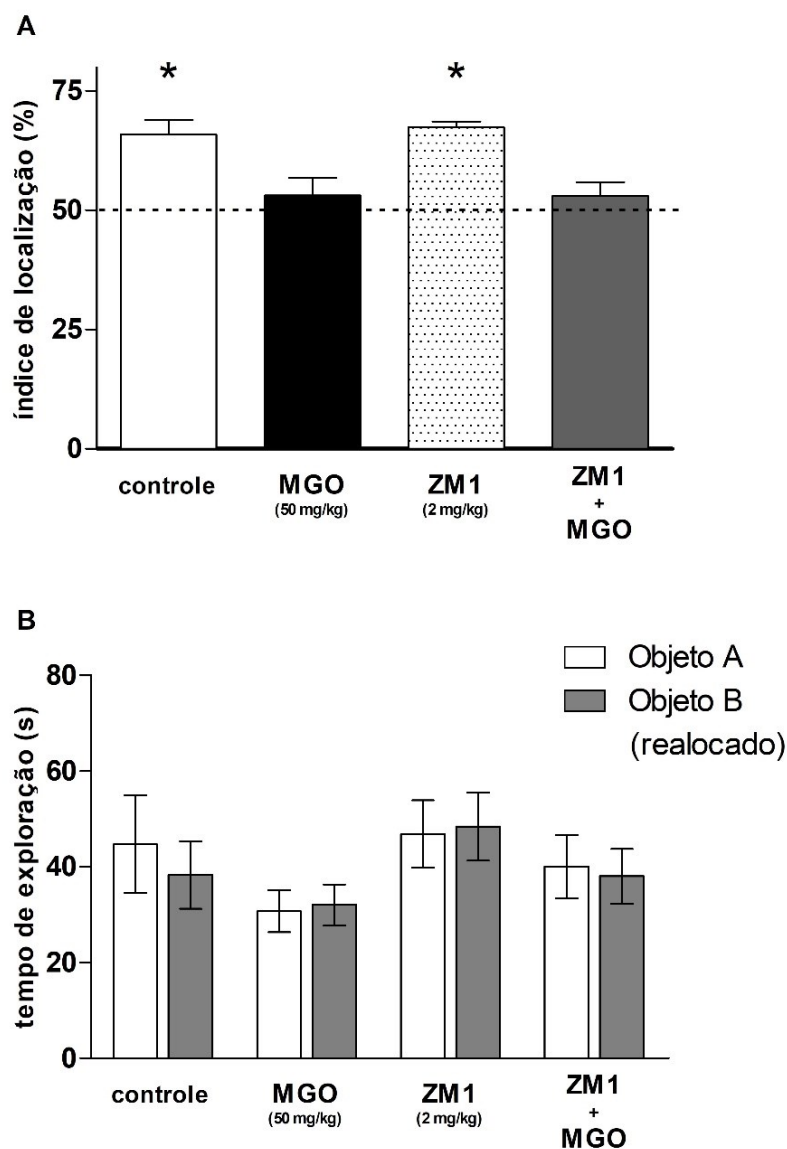


Figura 39. Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória espacial de longo prazo (24 h) de camundongos. Os animais foram tratados por 8 dias com metilglioxal (MGO - 50 mg/kg, i. p.) ou FPS-ZM1 (ZM1 - 2 mg/kg, i. p.) ou em conjunto (ZM1 + MGO) e avaliados na sessão teste do teste de realocação de objetos 24 h após a sessão treino e 20 h após a última administração. São mostradas o A) índice de localização (%) do objeto realocado na sessão teste e o B) tempo (s) de exploração dos dois objetos idênticos na sessão treino. As barras representam a média \pm E. P. M. de 7 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com 50% indicado pelas linhas tracejadas (teste *t* de Student).

6.3.2.3. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória de trabalho de camundongos

A avaliação da memória de trabalho dos animais foi avaliada através da taxa de alternâncias espontâneas no labirinto em Y (Fig. 40A). No dia 10 do tratamento repetido o teste foi executado e as entradas nos braços foram registradas. A taxa de alternâncias se mostrou significativamente diminuída nos animais tratados apenas com MGO [$F_{(3,24)}=7,734$; $p < 0,05$], quando comparados com o grupo controle, indicando comprometimento da memória de trabalho (Fig. 40A).

Os animais tratados apenas com ZM1 não apresentaram diferenças na taxa de alternâncias, em relação ao grupo controle. Além disso, o ZM1 foi capaz de impedir completamente os déficits da memória de trabalho induzidos pelo MGO, uma vez que quando em cotratamento com MGO, os resultados do grupo ZM1 + MGO não revelaram diferença estatística em relação ao grupo controle, e o grupo com déficit (MGO) apresentou uma média da taxa de alternâncias significativamente diferente do grupo ZM1 + MGO, bem como, quando comparado aos demais grupos [$F_{(3,24)}=7,734$; $p < 0,05$] (Fig. 40A). Quanto ao número relativo de entradas nos braços, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos [$F_{(3,24)}=1,910$; $p > 0,05$], validando os resultados encontrados (Fig. 40B).

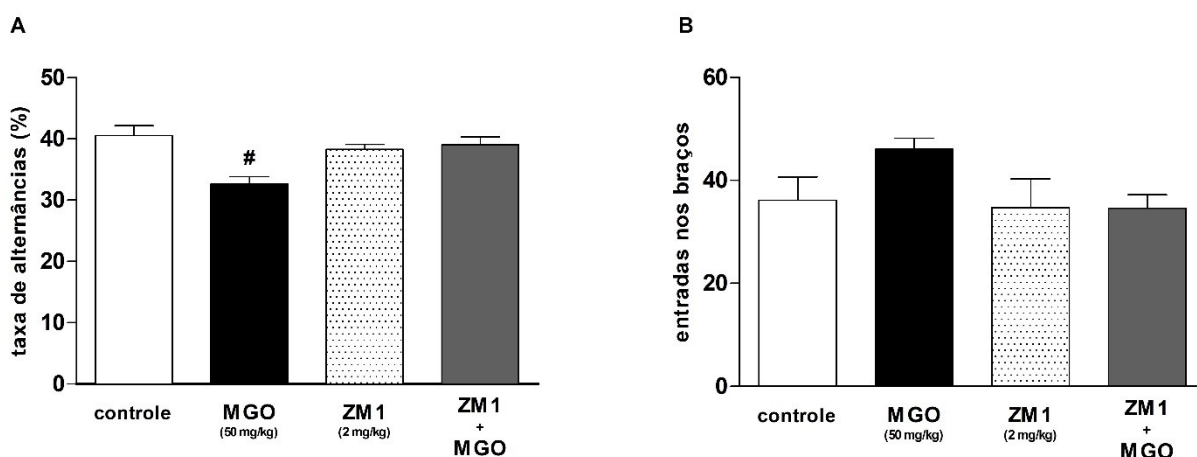


Figura 40. Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória de trabalho de camundongos. Os animais foram tratados por 9 dias com metilglioxal (MGO - 50 mg/kg, i. p.) ou FPS-ZM1 (ZM1 - 2 mg/kg, i. p.) ou em conjunto (ZM1 + MGO) e avaliados 24 h após a última administração. Foram registradas a A) taxa de alternâncias (%) e o B) número de entradas nos braços do labirinto em Y. As barras representam a média \pm E. P. M. de 7 animais por grupo. # $p < 0,05$ comparado a todos os grupos (teste post hoc de Newman-Keuls).

6.3.2.4. Efeitos do tratamento repetido com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória aversiva de curto prazo de camundongos

Para a avaliação da memória aversiva de curto prazo, foi utilizado o teste de esquiava inibitória do tipo *step-down*. Assim, no dia 11 do tratamento os animais foram testados 1,5 h após a sessão treino (aprendizado) na qual receberam um estímulo elétrico. Os tempos de latência para descer da plataforma nas duas sessões foram utilizados na análise estatística de Kruskal-Wallis, seguido da comparação de Dunn. Os resultados revelaram que apenas o grupo tratado com MGO não apresentou um tempo de latência significativamente maior ($p < 0,05$) na sessão teste, quando comparado com sua respectiva latência na sessão treino. Isto é um indicativo de déficit de memória aversiva de curto prazo, conforme demonstrado anteriormente. O grupo tratado somente com ZM1 teve sua memória preservada. O ZM1 foi capaz de impedir o prejuízo de memória de curto prazo induzido pelo MGO, uma vez que os animais tratados com ZM1 e MGO apresentaram um tempo de latência significativamente maior para descer da plataforma, quando comparado à sua sessão treino (Fig. 41).

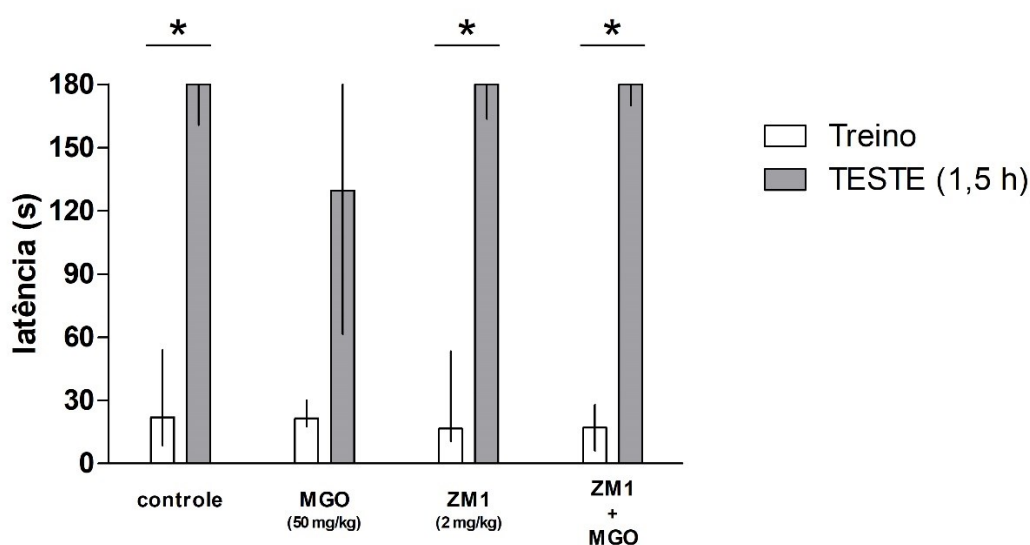


Figura 41. Efeitos dos cotratamentos repetidos com metilglioxal e FPS-ZM1 sobre a memória aversiva de curto prazo (1,5 h) de camundongos. Os animais foram tratados por 10 dias com metilglioxal (MGO - 50 mg/kg, i. p.) ou FPS-ZM1 (ZM1 - 2 mg/kg, i. p.) ou em conjunto (ZM1 + MGO) e avaliados 24 h após a última administração nas sessões do teste de esquiava inibitória do tipo *step-down*. A memória foi avaliada 1,5 h após a sessão treino com base na latência de descida da plataforma (s) durante a sessão teste. As barras representam a mediana com amplitude interquartil de 6-7 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado à sessão treino do mesmo grupo (teste de Kruskal-Wallis seguido de comparação de Dunn).

6.4. Sumário de resultados

Quadro 1 – Sumário dos principais resultados dos testes comportamentais após tratamento com camundongos.

Efeito	Teste	Droga	Dose (mg/kg)	Regime
Hipolocomoção	Campo aberto	MGO	80, 200	Agudo (4 h)
Disfunção da memória espacial de curto prazo	Realocação de objeto	MGO	20	Agudo (3,6 h)
Comportamento tipo-depressivo	Suspensão pela cauda	MGO	20	Repetido (5 dias)
Disfunção da memória espacial de curto prazo	Realocação de objeto	MGO	20	Repetido (6 dias)
Déficit da memória de trabalho	Alternância espontânea	MGO	50	Repetido (6, 9 dias)
Disfunção da memória espacial de longo prazo	Realocação de objeto	MGO	25, 50	Repetido (8 dias)
Disfunção da memória de reconhecimento de longo prazo	Reconhecimento de objeto	MGO	50	Repetido (8 dias)
Disfunção da memória aversiva de curto prazo	Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	MGO	10, 25, 50	Repetido (9 dias)
Disfunção da memória aversiva de curto prazo	Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	MGO	50	Repetido (10 dias)
Disfunção da memória aversiva de longo prazo	Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	MGO	10, 50	Repetido (10 dias)
Disfunção da memória espacial de longo prazo	Realocação de objeto	MGO	50	Repetido (11 dias)
Déficit da memória de trabalho	Alternância espontânea	Bicuculina + MGO	2 + 50	Repetido (6 dias)
Prevenção parcial do déficit da memória de trabalho	Alternância espontânea	Bupropiona + MGO	10 + 50	Repetido (6 dias)
Prevenção parcial do déficit da memória de trabalho	Alternância espontânea	Cetamina + MGO	1 + 50	Repetido (6 dias)
Prevenção parcial do déficit da memória de trabalho	Alternância espontânea	Muscimol + MGO	0,5 + 50	Repetido (6 dias)
Disfunção da memória espacial de longo prazo	Realocação de objeto	Bupropiona + MGO	10 + 50	Repetido (10 dias)
Disfunção da memória espacial de longo prazo	Realocação de objeto	Cetamina + MGO	1 + 50	Repetido (10 dias)
Disfunção da memória espacial de longo prazo	Realocação de objeto	Muscimol + MGO	0,5 + 50	Repetido (10 dias)
Disfunção da memória espacial de longo prazo	Realocação de objeto	Bicuculina + MGO	2 + 50	Repetido (10 dias)
Disfunção da memória espacial de longo prazo	Realocação de objeto	ZM1 + MGO	2 + 50	Repetido (8 dias)
Prevenção total do déficit da memória de trabalho	Alternância espontânea	ZM1 + MGO	2 + 50	Repetido (9 dias)
Prevenção da disfunção da memória aversiva de curto prazo	Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	ZM1 + MGO	2 + 50	Repetido (10 dias)

Quadro 2 – Sumário dos principais resultados das análises bioquímicas após tratamento com camundongos.

Efeito	Tecido	Drogas	Dose (mg/kg)	Regime
Diminuição nos níveis de Glo1	Hipocampo	MGO	10	Repetido (11 dias)
Diminuição nos níveis de Glo1	Córtex pré-frontal	MGO	50	Repetido (11 dias)
Diminuição nos níveis de DA	Córtex pré-frontal	MGO	50	Repetido (11 dias)

7. DISCUSSÃO

Considerando a investigação do MGO *in vivo*, há poucos estudos explorando os seus efeitos. Assim, foi elaborado um grande protocolo para o tratamento de camundongos investigando várias doses e regimes de MGO (10-200 mg/kg). Como foi demonstrado previamente, a dose de 800 mg/kg (i.p.) é letal (KALAPOUS et al., 1991; CHOUDHARY et al., 1997). Decidiu-se, então, escolher para este estudo doses de no máximo até 25% (≤ 200 mg/kg) da dose letal. Os tratamentos foram feitos de maneira aguda, com uma única injeção, ou administrações repetidas de até 11 dias, de ação do MGO no protocolo de doses repetidas. No protocolo com doses repetidas, os testes comportamentais foram realizados ao longo do tratamento, sempre 24 h após a última administração. Os testes neuroquímicos foram realizados após o fim dos tratamentos, no mínimo 24 h após a última administração.

Diabetes é uma doença complexa, no entanto, tentou-se reproduzir a característica de níveis aumentados de MGO no plasma através de injeção sistêmica de MGO em camundongos. A exemplo de níveis plasmáticos de MGO elevados que são encontrados no plasma de pacientes diabéticos (THORNALLEY, 1993; KONG et al., 2014). Assim, foram avaliados os efeitos dos tratamentos através de diferentes modelos animais. Foram investigadas diferentes doses e em dois regimes de tratamento: agudo e repetido. E ao fim do tratamento, foram avaliados os níveis plasmáticos de MGO. Além disso, alterações nos sistemas de detoxificação do MGO podem levar ao seu acúmulo nos tecidos, contribuindo assim para o estresse dicarbonílico, no qual o MGO é o principal agente (THORNALLEY et al., 1999; THORNALLEY & RABBANI, 2011; RABBANI et al., 2016). Considerando isso, também foram avaliadas as glioxalases, componentes do sistema de detoxificação do MGO, no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais.

Em estudo realizado por Ghosh e colegas (2006) investigando a farmacocinética do MGO em camundongos, ficou demonstrado que seu pico plasmático ocorre em torno de 4 h após o tratamento, com diferenças significativas no plasma surgindo após 2 h de tratamento. Para confirmar a eficácia do tratamento com MGO do presente trabalho, em experimentos paralelos do grupo do laboratório, também foram medidos os níveis de MGO no plasma 4 h após uma única administração i. p. em camundongos, onde os valores se mostraram aumentar significativamente a partir da dose de 25 mg/kg (SZCZEPANIK et al., 2020). Contudo, um dos principais interesses do presente estudo foi investigar os efeitos de tratamentos repetidos com

MGO. Portanto, foram avaliados os níveis plasmáticos de MGO 24 h após a última injeção diária ao final de 11 dias de tratamento. Os grupos tratados com MGO não apresentaram diferenças estatísticas com os animais controle (Tab. 2). Kalapos (2013), sugeriu que embora o MGO originário de fontes externas exerce efeitos no organismo, devido à sua natureza reativa parece improvável que ele se torne um importante contribuidor para os seus níveis plasmáticos, mas sim, contribua para os seus níveis a longo prazo em uma taxa bem abaixo do limite de detecção (KALAPOs, 2013). Dessa forma, os resultados do presente trabalho são evidências que o corroboram. Os resultados indicam que os níveis de MGO no plasma foram fisiologicamente normalizados 24 h após o tratamento e que o tratamento repetido não foi capaz de modificar seus níveis plasmáticos a longo prazo. Provavelmente, devido à sua alta reatividade, o MGO administrado foi em grande parte degradado pelo sistema das glioxalases ou conjugado a outras proteínas em um período inferior à 24 h (THORNALLEY, 2008; DEGEN et al., 2013). Além disso, foi demonstrado, que sob condições fisiológicas, 70% do MGO livre reage com a albumina sérica bovina dentro de um período de 15 h (LO et al., 1994). Isto explicaria o fato dos níveis do MGO estarem ao nível do grupo controle 24 h após a última administração.

O sistema das glioxalases (Glo1 e Glo2) é o principal sistema de detoxificação do MGO (SOUSA SILVA et al., 2013). No presente estudo, o tratamento com MGO durante 11 dias causou uma diminuição significativa nos níveis de Glo1 no córtex pré-frontal (50 mg/kg) e no hipocampo (10 mg/kg). Relacionado a isso, foi verificado que os níveis de Glo1 foram encontrados diminuídos em amostras de sangue de pacientes diabéticos com nefropatia (HAMOUDANE et al., 2015). No entanto, no caso da diabetes, pode ocorrer também o aumento do conteúdo celular de enzimas envolvidas na detoxificação de α -oxoaldeídos (aldo-ceto redutases, Glo1 e Glo2), as quais também apresentaram níveis elevados em células mono- e polimorfonucleares (RATLIFF et al., 1996).

A investigação da via de detoxificação das glioxalases, seja *in vitro* ou *in vivo*, parece ser altamente relevante para situações patológicas, que vão além do diabetes. A isquemia encefálica, por exemplo, foi capaz de induzir um rápido aumento nos níveis de Glo1 em células endoteliais (3 h), seguido de um aumento nos neurônios (3 dias) e astrócitos (7 dias), o que indica que a isquemia é capaz de induzir um aumento acentuado no sistema das glioxalases (PIEROH et al., 2014), no entanto, aos 14 dias após a lesão cortical controlada, os níveis de Glo1 voltaram ao normal, mesmo em áreas próximas das lesões (PIEROH et al., 2018). Além disso, a injeção i. c. v. repetida de MGO (0,7 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) durante 5 dias, induziu um aumento dos níveis de RNAm e níveis proteicos da Glo1 no encéfalo de camundongos (HAMBSCHE et al.,

2010). Estes dados demonstram que os níveis de Glo1 respondem a alterações locais e de maneira temporal no SNC. O efeito contrário, com a diminuição dos níveis de Glo1 encontrados neste trabalho, podem ser decorrentes da via de administração usada. A injeção i. p. abre automaticamente a possibilidade de que os efeitos do MGO no SNC sejam alterados, ou até gerados, por efeitos sistêmicos do mesmo. Isso, de certa forma, associou os resultados aqui encontrados a um modelo mais próximo da condição diabética, corroborando com os níveis de Glo1 diminuídos encontrados em humanos com diabetes (HAMOUDANE et al., 2015).

A Glo1 representa a enzima chave da transformação do MGO de sua forma tóxica para a não tóxica, limitando a sua detoxificação completa ou parcial (THORNALLEY, 2003). Uma diminuição dos níveis de Glo1 está, assim, de acordo com o argumento em favor de um aumento dos níveis intracelulares de MGO livre capaz de gerar danos (ALLAMAN et al., 2015). Dessa forma, pode ser possível que os déficits cognitivos encontrados neste trabalho possam ser, ao menos em parte, influenciados pela alteração dos níveis da Glo1 ao longo do tratamento.

Além disso, uma vez que após o tratamento repetido o córtex pré-frontal dos animais apresentou redução dos níveis de Glo1 e DA, somados a déficits de memória dependentes do córtex pré-frontal. Foi decidido verificar a atividade enzimática da Glo1 no córtex pré-frontal. Os resultados mostraram que apesar dos diferentes déficits associados a essa estrutura, ao final do tratamento a atividade enzimática da Glo1 não apresentou diferenças significativas nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg quando comparadas ao controle. Semelhantemente, em outro estudo, após administrações repetidas de MGO (0,5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$, i. c. v.) em ratos por 6 dias, a atividade enzimática da Glo1 não foi alterada no córtex pré-frontal, e apenas um aumento transiente no hipocampo foi observado. Entretanto, a atividade enzimática no estudo foi avaliada 42 dias após a interrupção do tratamento (HANSEN et al., 2016).

Os níveis de Glo2 também foram avaliados e, no entanto, não foram encontradas alterações significativas no córtex pré-frontal ou no hipocampo dos animais. Utilizando células imortalizadas HT22 de hipocampo de camundongos, Dafre et al. (2015) descobriram que o MGO pode ser tanto benéfico quanto deletério ao sistema das glioxalases, dependendo da dose. Em baixas concentrações e curto prazo (horas), o MGO pode induzir fortemente a Glo2, mas em altas concentrações e maior tempo de exposição, o MGO pode inibir a Glo1 e diminuir os níveis de Glo2. Foi ainda posteriormente demonstrado que essa diminuição nos níveis de Glo2 foi mediada por autofagia, que foi dependente da ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (DAFRE et al., 2017). Com base nesses dados, observa-se que as alterações na expressão das glioxalases parecem ser dinâmicas e dependem das condições experimentais. Isso se justifica porque tanto o aumento quanto a diminuição da atividade e expressão foram

relatados, dependendo da dose, tempo de exposição e modelo utilizados. Contudo, os resultados do presente estudo revelam que a toxicidade do MGO *in vivo* parece ser duplamente deletéria, uma vez que ele comprometeu o seu principal sistema de detoxificação celular.

Devido à alta capacidade do MGO em interferir nas reações de oxirredução celulares e gerar ERO que promovem processos de peroxidação lipídica (DMITRIEV & TITOV, 2010; RABBANI & THORNALLEY, 2015), após o tratamento com MGO, foram também avaliados os níveis de 4-HNE e MDA no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais. Os resultados mostraram que não houveram alterações significativas desses dois parâmetros, não revelando, assim, danos oxidativos evidentes pelo tratamento repetido com MGO.

Um dos principais objetivos deste trabalho, no entanto, foi investigar se a memória em diferentes modalidades pode ser afetada por tratamentos agudos ou repetidos com MGO. Entretanto, antes de abordar esse assunto, optou-se por entender melhor os potenciais efeitos do MGO sobre a atividade locomotora e desempenho motor. Quando o tratamento foi de forma aguda (4 h), e em doses mais altas (80 e 200 mg/kg), o MGO prejudicou a atividade locomotora em camundongos de maneira dose-dependente, como observado no campo aberto. No entanto, essa hipolocomoção não pode ser atribuída por danos grosseiros das funções motoras dos animais, pois os resultados mostram que as mesmas foram preservadas no teste do poste, tanto no tratamento agudo quanto no repetido. Além disso, o MGO agudo (200 mg/kg, i. p.) causou diminuição do *grooming* e *rearing* e aumentou o tempo de imobilidade dos animais no campo aberto. Todas essas características juntas estão relacionadas a uma diminuição da atividade locomotora geral dos animais devido a *status* motivacional ou comportamento do tipo ansioso (PAUL et al., 2007; BELZUNG, 1999; KALUEFF et al., 2016).

Em estudos anteriores, o MGO reduziu o comportamento tipo-ansioso no campo aberto, após sua administração aguda, sugerindo assim, o potencial uso terapêutico da modulação dos níveis de MGO no tratamento de transtornos de ansiedade (DISTLER & PALMER, 2012b; DISTLER et al., 2012a; MCMURRAY et al., 2016). Neste estudo, os animais tratados agudamente com MGO (80, 200 mg/kg, i. p.) diminuíram o número de entradas e o tempo de permanência na área central do campo aberto, o que poderia estar relacionado ao comportamento tipo-ansioso (PRUT & BELZUNG, 2003). No entanto, esse efeito é provavelmente devido à diminuição da atividade locomotora causada pela administração aguda de MGO, como observado pela diminuição da distância percorrida e aumento do tempo de imobilidade detectado no campo aberto nessas doses. Dessa forma, a hipolocomoção causada pela administração aguda de MGO adicionou vieses ao teste, dificultando inferências adicionais.

Por outro lado, o tratamento repetido com MGO (10, 25, 50 mg/kg, i. p.) não afetou a atividade locomotora espontânea, agilidade vertical, força ou coordenação motora, nem parâmetros relacionados à ansiedade, como tempo e número de entradas na região central do campo aberto, bem como a ausência de alterações na tigmotaxia. Esses parâmetros foram verificados através dos testes de campo aberto, alternância espontânea, barras horizontais e teste de poste. Nesse caso, também pode-se concluir que a administração repetida de MGO não induziu alterações no comportamento tipo-ansioso nos animais. Além disso, o fenômeno de habituação dos animais observado no campo aberto, quando há uma redução progressiva da atividade locomotora ao longo do teste (BELZUNG, 1999) (Fig. 21A), denota que o MGO repetido também não induziu comportamento do tipo hiperativo ou hiperlocomoção nos animais. Quanto em tratamento repetido ou em cotratamento com as demais drogas utilizadas, os animais também não apresentaram alterações na atividade locomotora ou em parâmetros de ansiedade, no campo aberto. A ausência de efeitos motores adversos, nas doses de 10, 20, 25 e 50 mg/kg de MGO, indicam que estas são apropriadas para os testes de memória, as quais foram subsequentemente exploradas no tratamento repetido.

Todos esses efeitos agudos são considerados característicos de ação inibitória no SNC, que podem ser desencadeadas pela ativação dos GABA_AR. Considerando que o MGO pode agir como um agonista parcial competitivo de GABA_AR (DISTLER et al., 2012a), não somente o acúmulo patológico de MGO poderia exercer seus efeitos no SNC, porém, espera-se que a sua produção endógena também assuma algum papel. Além disso, verificou-se que em altas doses agudas, o MGO pode causar depressão locomotora, ataxia e hipotermia em camundongos, característicos de ativação GABAérgica (DISTLER et al., 2012a). Esses achados foram corroborados pelos dados aqui presentes, uma vez que a hipolocomoção foi observada no teste de campo aberto apenas 4 h após uma única injeção de MGO e somente nas doses mais altas de 80 e 200 mg/kg, mas não nas doses de 10, 20, 25 e 50 mg/kg de MGO. Isso indica que, após a injeção sistêmica, os efeitos agudos do MGO sobre a atividade locomotora em camundongos surgem apenas quando em doses muito superiores (DISTLER et al., 2012b; JOHNSTON, 2005; CHUA & CHEBIB, 2017).

A inibição tônica através da ativação dos receptores para GABA diminui a resistência de *inputs* celulares, o que por sua vez, diminui a propagação de correntes excitatórias e diminui a probabilidade de que *inputs* excitatórios iniciem um potencial de ação (KULLMANN et al., 2005; ÇIÇEK, 2018). O MGO é gerado intracelularmente tanto por neurônios quanto por células gliais, e como é permeável à membrana plasmática, pode ativar os GABA_AR de maneira parácrina (DISTLER et al., 2012a). Caso esta hipótese esteja correta, espera-se que o MGO

ative os GABA_AR sinápticos, que regulam a sinalização inibitória fásica, bem como os GABA_AR somáticos, dendríticos e axonais, que contribuem para sinalização inibitória tônica, o que por sua vez, pode influenciar diferentes efeitos fisiológicos e comportamentais (HABLITZ et al., 2009; CHUA & CHEBIB, 2017).

Durante a triagem inicial de doses do MGO, foram avaliados também os efeitos do tratamento nos camundongos utilizando os testes para comportamento tipo-depressivo e interação social.

Comportamentos tipo-depressivo têm sido associados a comprometimentos da neuroplasticidade, como atrofia neuronal e perda sináptica no córtex pré-frontal e hipocampo (PRICE & DUMAN, 2019). Sobretudo, comportamentos depressivos e anedônicos são dificilmente dissociados de prejuízos cognitivos em humanos, sendo que prejuízo cognitivo é considerado um fator que caracteriza o TDM (BAUNE & RENGER, 2014). De acordo com Cryan et al. (2005), o teste de suspensão pela cauda é um dos testes comportamentais mais utilizados para a avaliação de compostos ou substâncias com ação antidepressiva em camundongos, sendo um teste pré-clínico de boa validade preditiva. Aqui, os animais tratados com MGO apresentaram comportamento tipo-depressivo no teste de suspensão pela cauda (Fig. 25). Nesse sentido, os resultados encontrados corroboram a associação entre prejuízos de memória e comportamento tipo-depressivo, uma vez que ambos os efeitos foram encontrados nos animais tratados com MGO.

Além disso, a interação social dificultada representa um dos sintomas que caracterizam o TEA em humanos, que se soma à dificuldades de comunicação e comportamentos restritos e repetitivos (CRIPPA et al., 2016). Acredita-se que a etiologia do TEA comece cedo no desenvolvimento do SNC, uma vez que a organização arquetônica e a conectividade de circuitos neuronais foram identificados como principais contribuintes para a progressão dos sintomas. Embora estudos sugiram um papel crítico de fatores genéticos, sua etiologia é considerada multifatorial (MAXIMO et al., 2014; CRIPPA et al., 2016). A investigação do TEA é basicamente feita através da avaliação comportamental, uma vez que até o momento inexistem biomarcadores estabelecidos para o diagnóstico. Para tanto, pode-se utilizar modelos animais apropriados para estudos experimentais (CHANG et al., 2017). Considerando que o TEA já foi associado com altos níveis de MGO e AGEs em humanos (JUNAID et al., 2004), no presente estudo, foi investigado apenas o possível surgimento de interação social debilitada entre os animais tratados com MGO. Dessa forma, após um tratamento repetido com MGO, foi realizado o teste de interação social. Apesar das diferentes doses testadas, os resultados não revelaram

diferenças significativas quanto à interação social dos animais tratados, quando expostos a animais desconhecidos não tratados.

Quanto aos prejuízos cognitivos causados pelo MGO, a avaliação comportamental sobre parâmetros cognitivos, neste estudo, através das diferentes baterias de testes, incluiu as memórias espacial, de reconhecimento, aversiva, em paradigmas de curto e longo prazos, e a memória de trabalho. Após verificado que o MGO na dose de 20 mg/kg (i. p.) não causou alterações na atividade locomotora dos animais tratados agudamente, esta mesma dose foi testada nos testes de realocação de objeto e esquiva inibitória. Assim, foram revelados déficits de memória espacial de curto prazo, conforme avaliada nos animais após tratamento agudo ou repetido (6 dias). No entanto, a mesma dose (20 mg/kg) em regime agudo, não foi capaz de prejudicar a memória aversiva de curto e longo prazos, conforme avaliada no teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*.

Em seguida, experimentos foram conduzidos para melhor investigar os efeitos não agudos do MGO, sobre a aprendizagem e memória, em regime de tratamento mais prolongado (repetido) e também explorando outras doses. No tratamento repetido, semelhantemente aos experimentos agudos, o MGO induziu déficits de memória, avaliado através de diferentes paradigmas: alternância espontânea (50 mg/kg, i. p. - 7 dias), realocação de objeto (25 mg e 50 mg/kg, i. p. - 9 dias), reconhecimento de objeto (50 mg/kg, i. p. - 9 dias) e esquiva inibitória (10, 25 e 50 mg/kg, i. p. - 10 e 11 dias). Os resultados mostraram que, de acordo com a dose utilizada, o MGO não apenas causou prejuízos sobre a memória de trabalho e de curto prazo, mas também afetou a consolidação da memória nos modelos espacial, de reconhecimento e memória aversiva.

O tratamento repetido com MGO durante 8 dias prejudicou a memória de longo prazo dos animais nas doses de 25 e 50 mg/kg (i. p.) avaliado através do teste de realocação de objeto, e na dose de 50 mg/kg (i. p.) quando avaliado através do teste de reconhecimento de objeto, também após 8 dias de tratamento. Essa disparidade pode relacionar-se às especificidades dos dois modelos comportamentais. Contudo, em razão de ambos apresentarem características semelhantes e seguirem o mesmo protocolo de tratamento, esse resultado pode estar relacionado às diferenças intrínsecas entre as memórias espacial e de reconhecimento. Além disso, considerando a estreita dependência da memória espacial com a formação hipocampal (ASSINI et al., 2009; KNAPP & KLANN, 2002; SERRANO & KLANN, 2004), um maior comprometimento da memória espacial, como observado no presente trabalho, pode ser indicador de sua sensibilidade, sugerindo dessa forma o aumento da vulnerabilidade do hipocampo em relação a esse tipo de memória após a exposição ao MGO exógeno.

Em um estudo recente, o MGO (0,5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) foi continuamente aplicado nos ventrículos encefálicos de ratos por 6 dias e testes comportamentais foram realizados 3 semanas depois. Foi observado comprometimento da memória de reconhecimento de curto prazo, uma vez que, quando testados, os ratos não foram capazes de discriminar o novo objeto. Porém, a memória de trabalho não foi alterada quando a taxa de alternância espontânea dos animais foi avaliada no labirinto em Y. O comprometimento da memória observado foi atribuído como sendo um efeito da formação de AGEs (HANSEN et al., 2016). No presente estudo, diferentemente, o MGO foi aplicado por injeção intraperitoneal em camundongos e déficits na memória de curto prazo também foram encontrados. Além disso, observou-se comprometimento da memória de trabalho. Em geral, a formação de AGEs ocorre durante um período de várias horas a semanas (LO et al., 1994; SINGH et al., 2001) e a apoptose induzida pelo MGO leva horas a dias (DI LORETO et al., 2008). Uma vez que foi encontrado comprometimento da memória em um breve período de tempo (entre 3,6 h até 11 dias), isso sugere que a toxicidade neuronal ou os AGEs como produtos tardios, não foram direta e isoladamente responsáveis pelo comprometimento da memória observado no tratamento agudo.

Assim, outros mecanismos podem ter algum papel nos déficits encontrados. Além disso, o MGO pode mediar mudanças comportamentais no perfil de ansiedade de camundongos dentro de minutos (~ 10 min) após administração periférica e nenhuma evidência de aumento de apoptose foi encontrada no SNC de camundongos tratados com uma dose ansiolítica de 50 mg/kg MGO (i. p.) (DISTLER et al., 2012a). Esta dose (50 mg/kg) representa a mais prejudicial dose utilizada no presente estudo, produzindo déficits em todos os parâmetros cognitivos. Portanto, pode ser que o MGO atue por diferentes mecanismos, dependendo da dose e do tempo de administração. Em modelos animais, a via de administração provavelmente também é um fator relevante, sendo uma área que requer mais investigação.

Diferentemente do tratamento agudo, o comprometimento cognitivo observado no tratamento repetido é mais provável ser dependente de AGEs. Na literatura, a ligação entre MGO, AGEs/ativação de RAGE e disfunções cognitivas tem sido associada e observada em diferentes casos crônicos de distúrbios metabólicos ou neurodegenerativos, como diabetes e Alzheimer (THORNALLEY & RABBANI, 2011; ALLAMAN et al., 2015; JASH et al., 2019).

O único teste comportamental no qual o MGO afetou a memória com a dose de 10 mg/kg (i. p.) foi no teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*, após 10 e 11 dias de tratamento. De outra forma, déficits relacionados com a memória de trabalho foram observados apenas quando a dose mais alta de MGO foi utilizada (50 mg/kg, i. p.), em que os animais exibiram menor desempenho na taxa de alternância espontânea no labirinto em Y, quando comparados com os

animais controle. As diminuições significativas nos níveis de Glol e neurotransmissores (DA), ambos os efeitos no córtex pré-frontal e nessa mesma dose (50 mg/kg), sugerem ter influenciado na diminuição da performance da memória de trabalho observada nos animais.

Os níveis das monoaminas DA, NA e 5-HT foram medidos no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais. Os níveis de DA no córtex pré-frontal foram encontrados significativamente diminuídos após o tratamento com MGO em sua maior dose (50 mg/kg, por 11 dias). Pode ser que os menores níveis de DA estejam relacionados com a diminuição do desempenho da memória de trabalho dos animais, quando avaliados no labirinto em Y. Tanto a estrutura, quanto os níveis de DA atuando como neurotransmissores, no córtex pré-frontal de mamíferos, são particularmente importantes para a estabilização de representações de metas na memória de trabalho, as quais precisam ser ajustadas momento-a-momento (VAN SCHOUWENBURG et al., 2010; COOLS, 2016; OTERO, 2017). É importante ressaltar que, até onde se sabe, essa é a primeira evidência da possível ligação do MGO com níveis diminuídos de DA, um importante neurotransmissor do SNC envolvido em vários processos, além da memória de trabalho (COOLS, 2016). Como os níveis de DA no hipocampo ficaram abaixo do limite de detecção do método, pode ser que o MGO também afete os níveis de DA nesta estrutura, o que precisa ser confirmado experimentalmente.

A relevância em se avaliar a memória de trabalho é que esta pode refletir em melhores medidas, se comparadas à memória de curto prazo. A memória de trabalho foi correlacionada com aptidões intelectuais em humanos, especialmente com a inteligência fluida, o que é possivelmente a melhor forma de mensuração desse processo cognitivo em particular (COWAN, 2008). Inteligência ou raciocínio fluído pode ser interpretado como o tipo de pensamento que um indivíduo pode usar quando confrontado com uma tarefa relativamente nova que não pode ser executada automaticamente. Esse processo é dependente da atividade de redes frontoparietais, principalmente, o córtex pré-frontal rostralateral (OTERO, 2017). Nesse sentido, se for considerado que o tratamento com o MGO foi capaz de influenciar negativamente no desempenho da memória de trabalho dos animais, espera-se que déficits cognitivos sejam encontrados nos pacientes em condições onde há o acúmulo patológico do MGO. De fato, vários estudos mostraram que a diabetes leva ao comprometimento cognitivo, incluindo déficits associados à memória de trabalho (MILES & ROOT, 1922; BIESSELS et al., 2006; KODL & SEAQUIST, 2008; KOPF & FROLICH, 2009).

A DA (Fig. 42A) desempenha papéis importantes nas funções motoras e cognitivas, bem como no processamento de recompensas. (GARDONI & BELLONE, 2015). No presente estudo, foi encontrado diminuição dos níveis de DA no córtex pré-frontal dos animais

submetidos a tratamento repetido com MGO. Não foi investigado quais seriam os mecanismos precisos subjacentes a esse efeito. No entanto, diferentes fatores podem ser considerados para explicar a depleção de DA observada. A saber, foi demonstrado que o MGO pode reagir com monoaminas e gerar radicais livres (HIPKISS, 2017). Também, quando células neuronais foram expostas ao MGO, o salsolinol que é uma toxina derivada da DA, apresentou níveis aumentados (XIE et al., 2014). Sob condições fisiológicas, o MGO também pode reagir com a DA e gerar a neurotoxina 1-acetil-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina (ADTIQ), um produto semelhante ao salsolinol. A ADTIQ é encontrada acumulada no SNC de pacientes com doença de Parkinson (HIPKISS, 2017; DENG et al., 2012). Além disso, ratos diabéticos apresentaram níveis elevados tanto de ADTIQ, como de MGO, no encéfalo (SONG et al., 2014). Portanto, o MGO, presumivelmente, pode ter tido um papel direto na depleção de DA no córtex pré-frontal dos animais. Além disso, os autorreceptores pré-sinápticos de DA localizados em neurônios dopaminérgicos, geralmente fornecem um importante mecanismo de *feedback* negativo. Estes autorreceptores podem regular a síntese de DA inibindo a atividade da tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante da sua síntese. Além disso, os autorreceptores dopaminérgicos podem ajustar a taxa de disparo neuronal e a liberação de DA em resposta a alterações nos níveis extracelulares de DA (ANZALONE et al., 2012; FORD, 2014). Dessa forma, prováveis efeitos indiretos do MGO sobre a homeostase da DA e suas implicações também não devem ser descartados.

Como neste estudo não foram realizadas as medições da síntese e degradação de DA (por exemplo, a expressão e atividade da TH), nem liberação e formação de metabólitos da DA (por exemplo, ADTIQ; ácido 3,4-di-hidroxifenilacético – DOPAC; ácido homovalínico – HVA; 3-metoxitiramina – 3-MT; etc.), não se pode concluir que o MGO perturba a homeostase da DA no SNC (JUÁREZ OLGUÍN et al., 2016). No entanto, os resultados estimulam uma investigação mais aprofundada nesse sentido.

Em um estudo recente por Koike et al. (2019), observou-se que os níveis de MGO podem diferir muito dependendo da estrutura encefálica e que essas diferenças estão positivamente correlacionadas com os níveis de Glo1 de maneira a regular a concentração de MGO em cada tecido. Considerando isso, o córtex pré-frontal de camundongos apresenta níveis de MGO ($0,006 \pm 0,002 \mu\text{mol/g}$ de proteína) muito baixos, quando comparados a outras estruturas (KOIKE et al., 2019). Dessa forma, é provável que do ponto de vista funcional, o córtex pré-frontal seja mais sensível a alterações nos níveis de MGO endógeno, sejam decorrentes a um aumento de origem exógena ou por comprometimento dos seus sistemas de detoxificação celular. De acordo com isso, o presente estudo detectou na mesma dose (50 mg/kg), além de uma diminuição significativa de DA, diminuições nos níveis de Glo1, que

podem ter contribuído para as demais alterações causadas pelo tratamento através de um aumento relativo nos níveis de MGO no córtex pré-frontal. Refutando essa possibilidade, foi observado que a atividade da Glo1 se mostrou inalterada no córtex pré-frontal, porém, é sabido que alterações transientes, ou seja, antes do momento da mensuração da atividade enzimática da Glo1, podem ter ocorrido de forma a contribuir para um aumento do estresse dicarbonílico. E essas alterações resultantes, subsequentemente refletem em efeitos deletérios duradouros na fisiologia do tecido afetado, como a geração de AGEs e neuroinflamação (SOUSA SILVA et al., 2013; ALLAMAN et al., 2015). Além do mais, não foram avaliadas as atividades de outros sistemas de detoxificação do MGO, como as ADHs e AKRs, que também poderiam influenciar sobre os níveis de MGO corticais (RABBANI et al., 2016; PRATT-HYATT et al., 2013).

A diminuição nos níveis de DA encontrados, sugere que os déficits de memória de curto e longo prazos observados após o tratamento com MGO pode ser, ao menos em parte, mediado por transmissão dopaminérgica durante a fase de aquisição da memória. É nesta fase que processos atencionais no córtex pré-frontal em comunicação com outras regiões encefálicas favorecem a formação de memória (COWAN, 2008; GRAY et al., 2017). O prosencéfalo é innervado com neurônios dopaminérgicos provenientes da *substantia nigra pars compacta* e pela área tegmental ventral, que se originam em vários núcleos mesencefálicos e enviam aferentes para diferentes áreas no córtex pré-frontal (BJÖRKLUND & DUNNETT, 2007) (Fig. 42B). Além disso, foi demonstrado que a depleção de DA no encéfalo de roedores, utilizando 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) pode levar a prejuízos cognitivos extensos e que a interação entre as projeções dopaminérgicas do prosencéfalo e o córtex pré-frontal é crítica para a memória de objetos (CHAO et al., 2013).

A importância da DA para a aprendizagem e memória, especialmente no córtex pré-frontal, ainda não é profundamente compreendida (PUIG et al., 2014). No entanto, esta parece ser importante para a memória de trabalho e processos cognitivos dependentes do córtex pré-frontal. Um exemplo pode ser visto na doença de Parkinson, que apresenta a perda de neurônios dopaminérgicos e diminuição dos níveis de DA (KALIA & LANG, 2015). Em um teste de memória de trabalho espacial, pacientes com doença de Parkinson recebendo levodopa (precursor de DA), apresentaram um melhor desempenho de memória quando estavam sendo tratados em comparação com quando não estavam recebendo levodopa. Esses dados sugerem que a DA é necessária para um desempenho adequado da memória de trabalho espacial (LANGE et al., 1992). E pacientes com esquizofrenia exibem déficits de aprendizagem e memória, com indícios de que a memória de trabalho é afetada mais severamente do que simplesmente a atenção dos pacientes (KALKSTEIN et al., 2010). E essas condições na

esquizofrenia são acompanhadas por desbalanços na neurotransmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal (THOMPSON et al., 2014). Além disso, a administração de 6-OHDA em ratos causou uma diminuição seletiva da plasticidade sináptica no córtex pré-frontal medial, acompanhada de depleção nos níveis de DA e prejuízos nas memórias espacial e de reconhecimento, de curto prazo (MATHEUS et al., 2016).

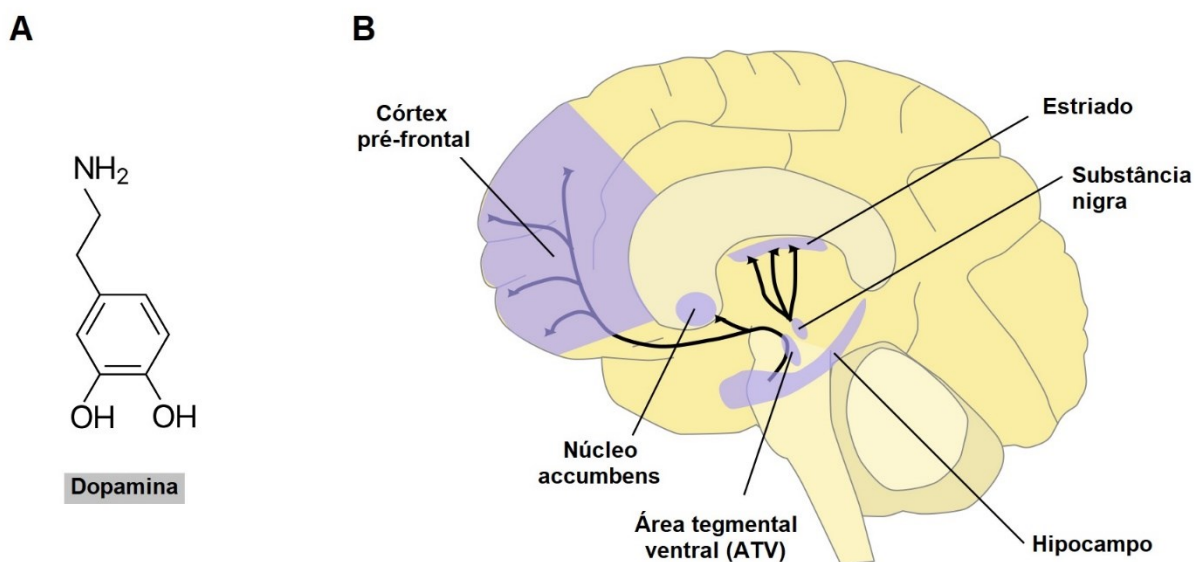


Figura 42. Dopamina e vias dopaminérgicas. A) Fórmula estrutural da dopamina ($C_8H_{11}NO_2$) – DA. (Nome IUPAC: 4-(2-Aminoetil)benzeno-1,2-diol – 153.18 g/mol) (adaptado de www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019); B) Representação das principais vias neuronais dopaminérgicas e suas estruturas envolvidas no sistema nervoso central humano (adaptado de www.oist.jp – Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, Okinawa, Japão, 2019).

No presente estudo, tentou-se aumentar a eficiência da neurotransmissão monoaminérgica, através do bloqueio da recaptação de DA e NA no cotratamento de bupropiona e MGO (VAN SCHOUWENBURG et al., 2010). Dessa forma, foi observado que os animais tratados com bupropiona apresentaram uma proteção parcial contra os déficits sobre a memória de trabalho induzidos pelo MGO no labirinto em Y. Esse resultado, assim, corrobora com a ideia da importância da DA para as funções cognitivas. Além disso, em humanos a bupropiona foi associada com um melhor desempenho da velocidade de processamento mental, muito dependente do córtex pré-frontal e memória de trabalho (FAVA ET AL., 2005; BAUNE & RENGER, 2014).

Outras drogas também são capazes de aumentar a neurotransmissão dopaminérgica. O metilfenidato e a anfetamina, utilizados no tratamento terapêutico para o transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), aumentam a atividade central da DA e NA, o que afeta a função executiva e atencional. As ações farmacológicas do metilfenidato incluem inibição do DAT e NET, ativação do receptor de 5-HT do tipo 1A e causar a redistribuição do transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT-2); Já a anfetamina é capaz de inibir o DAT, NET e VMAT-2 e inibir a atividade da monoamina oxidase (evitando a degradação de monoaminas) (FARAONE, 2018). Foi demonstrado que o tratamento com metilfenidato melhora a memória de trabalho, o controle inibitório e a flexibilidade mental de crianças com TDAH (BOLFER et al., 2017). De forma semelhante ao caso da levodopa (discutido acima), adultos com TDAH tratados com metilfenidato apresentaram melhora no desempenho da memória quando comparados a pacientes não medicados, mas ainda apresentaram comprometimento quando comparados a adultos controles saudáveis (FUERMAIER et al., 2017). Além disso, camundongos tratados com metilfenidato apresentaram uma melhor aquisição e retenção da memória espacial de longo prazo (CARMACK et al., 2014). De maneira semelhante, é caso da D-anfetamina, uma beta-feniletilamina usada no tratamento do TDAH e narcolepsia (HEAL et al., 2013). Esta droga, quando avaliada em ratos após sua infusão na amígdala, foi capaz de aumentar a aquisição da memória em abordagem discriminativa (HITCHCOTT et al., 1997). Além disso, em um estudo anterior, a D-anfetamina foi injetada no encéfalo de ratos em uma sessão pós-treino e foi observado um aumento da retenção de aprendizado, tanto em tarefas espaciais como não-espaciais em testes de labirinto aquático (PACKARD et al., 1994). Assim, o sistema dopaminérgico parece não modular apenas a memória de trabalho. A administração, tanto oral quanto intramuscular, de D-anfetamina aumentou a retenção da memória de reconhecimento de longo prazo em humanos (SOETENS et al., 1995). Portanto, todos esses resultados são evidências da importância da DA para as funções cognitivas, bem como, contribuem para explicar que a diminuição dos seus níveis pode, de fato, estar ligada a comprometimentos nas memórias de trabalho, de curto e longo prazos.

Além disso, a DA pode agir de forma a regular outros sistemas de neurotransmissão. A DA, por exemplo, pode regular os *inputs* de transmissão glutamatérgica, sendo que a liberação de DA influencia rapidamente a transmissão sináptica modulando os receptores do tipo AMPA e NMDA, os quais estão envolvidos em processos cognitivos e motores (CHAO et al., 2013; GARDONI & BELLONE, 2015). Dessa forma, é provável que a diminuição nos níveis de DA nos animais do presente estudo, também tenha influenciado através de outros sistemas, nos déficits de memória de longo prazo observados. Essas evidências corroboram mais uma vez,

que o sistema dopaminérgico participa como provável mediador também envolvido nos déficits cognitivos causados pelo MGO.

Apesar das evidências apresentadas e discutidas, não pode ser descartada que a depleção de DA no córtex pré-frontal, bem como as disfunções cognitivas observadas nos animais no presente trabalho possam ser consequência de alterações em outros sistemas de neurotransmissão que não foram investigados neste trabalho.

Quanto aos efeitos dos cotratamentos com o MGO, observou-se que o MGO reproduziu seu efeito causando um prejuízo da memória espacial no teste de realocação de objeto, conforme encontrado inicialmente. Quando em cotratamento com MGO, observou-se que a bupropiona, a cetamina, a bicuculina e o muscimol apresentaram baixos índices de discriminação do objeto realocado, indicando que estes não conseguiram impedir os efeitos deletérios do MGO sobre a memória espacial.

A diminuição na performance da memória de trabalho causada pelo MGO na dose de 50 mg/kg foi confirmada através de quatro experimentos independentes utilizando o teste de alternância espontânea. No entanto, os resultados mostram que os animais que receberam MGO (50 mg/kg) + bupropiona, cetamina, ou muscimol não apresentaram déficit da memória de trabalho, com uma performance similar ao controle, no mesmo teste. Entretanto, a taxa de alternâncias também não diferiu do grupo tratado com MGO, indicando um efeito parcial. De outra maneira, a taxa de alternâncias em cotratamento de MGO com bupropiona, cetamina, ou muscimol foram intermediárias entre o grupo controle e àquele tratado com MGO.

A partir dos resultados é um tanto difícil determinar os mecanismos de ação da bupropiona, cetamina e muscimol sobre a memória de trabalho. Os efeitos sobre a memória de longo prazo parecem ser mais conhecidos. Sobre a cetamina, por exemplo, tratamentos com poucas doses, ou até mesmo uma dose única, é capaz de aumentar os níveis de proteínas envolvidas na formação de sinapses (GluR1, PSD95, e sinapsina 1) e assim favorecer a consolidação da memória (PRICE & DUMAN, 2019). Contudo, já foi evidenciado em humanos uma associação entre uma melhor performance da memória de trabalho e níveis aumentados do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (HÅKANSSON et al., 2017). Nesse sentido, é sabido que a cetamina também leva rapidamente a um aumento do número e função de sinapses no córtex pré-frontal e é capaz de aumentar os níveis de BDNF. Estes dois últimos efeitos podem, portanto, influenciar positivamente o desempenho da memória de trabalho e assim terem contribuído para a restauração parcial do déficit encontrado (PRICE & DUMAN, 2019; HÅKANSSON et al., 2017; OTERO, 2017). Assim como, através do tratamento com a bupropiona, um provável aumento da eficiência da neurotransmissão monoaminérgica, pode

também ter contribuído positivamente sobre a memória de trabalho (VAN SCHOUWENBURG et al., 2010).

O fato da ausência de grupos tratados unicamente com bupropiona, cetamina, muscimol ou bicuculina no protocolo repetido, dificulta estabelecer aqui precisamente a pertinência das mesmas sobre os modelos testados. Em estudos prévios, o bloqueio de GABA_AR através do uso de bicuculina foi capaz de melhorar a memória aversiva e discriminativa em camundongos (BRIONI & MCGAUGH, 1988). Além disso a bicuculina restaurou prejuízos na memória espacial de roedores (MOUSAVI MAJD et al., 2018). No entanto, os resultados aqui apresentados mostram que o tratamento com bicuculina não foi eficaz em modificar os déficits, causados pelo MGO, tanto na memória espacial quanto na memória de trabalho. Por outro lado, de uma forma geral, a ativação de GABA_AR utilizando muscimol se mostrou deletéria para a cognição, principalmente por causar prejuízos na consolidação da memória em modelos animais (ZARRINDAST et al., 2002; NASEHI et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que microinjeções locais de muscimol na região encefálica da habênula lateral, prejudicaram a memória de trabalho em ratos (MATHIS et al. 2017). No entanto, a infusão de muscimol no córtex pré-frontal não causou nenhum comprometimento da memória de trabalho, também em ratos (AUGER & FLORESCO, 2014). No presente trabalho, a injeção sistêmica de muscimol parece impedir o déficit de memória de trabalho induzida pelo MGO. Dessa forma, observa-se que é provável a existência de especificidades do muscimol relativas a tecidos e tratamentos empregados. Investigações mais profundas são necessárias para deixar mais claro o papel da bicuculina e muscimol e sua pertinência sobre os efeitos causados pelo MGO e a memória de trabalho, através do sistema GABAérgico.

Em síntese, os mesmos animais que receberam MGO em cotratamento com bupropiona, cetamina ou muscimol apresentaram prejuízos da memória espacial, porém, não da memória de trabalho. Porém, quanto à memória de trabalho, os resultados indicam um efeito parcial na prevenção dos déficits, uma vez que a taxa de alternâncias destes grupos foi intermediário entre os grupos controle e MGO. Uma vez que, para os mesmos animais, o efeito foi observado em um teste e não em outro, isso demonstra que o MGO foi efetivo em causar danos a estes animais, ao passo que evidencia efeitos protetores da bupropiona, cetamina e muscimol sobre os déficits da memória de trabalho causados pelo MGO.

Assim, em conjunto os resultados sugerem que o MGO foi o principal agente responsável, mais uma vez, pelos prejuízos de memória observados quando em cotratamento. Além do mais, a literatura científica não denota prejuízos cognitivos detectáveis em modelos animais das respectivas doses das drogas aqui utilizadas. Outra evidência se dá pelo teste de

realocação de objeto, por exemplo, no qual observa-se que todos os grupos que receberam tratamento com MGO (50 mg/kg), independente da natureza do cotratamento, apresentaram comprometimento da memória espacial, enquanto que os grupos controle ou tratados unicamente com ZM1, foram naturalmente capazes da distinção entre os objetos familiar e realocado.

Conforme os resultados aqui apresentados, foi observado que o antagonismo de RAGE como prevenção aos prejuízos cognitivos causados pelo MGO se mostrou promissor. A maioria dos anticorpos anti-RAGE disponíveis, bloqueiam apenas o RAGE periférico e não atravessam a BHE. Além disso, podem apresentar efeitos tóxicos em doses terapêuticas. O ZM1, pelo contrário, atravessa a BHE com relativa facilidade e sua toxicidade foi avaliada em modelos de células e em camundongos, até a dose de 500 mg/kg (i. p.), não apresentando alterações nas funções fisiológicas, nem aumentos na taxa de infecção dos roedores (DEANE et al., 2012). Além disso, usando modelos murinos, estudos de vários grupos de pesquisa diferentes demonstraram que o bloqueio da sinalização do RAGE previne o desenvolvimento de respostas ligadas a numerosas patologias. E destacam o RAGE como um importante alvo terapêutico, como por exemplo, para vários tipos de câncer, quadros de inflamação crônica, diabetes e doença cardiovascular (TAGUCHI et al., 2000; HUDSON et al., 2008; BRALEY et al., 2016).

O MGO é um dos principais agentes de glicação, o que pode levar à formação de AGEs (LO et al., 1994; THORNALLEY, 2003; 2005; THORNALLEY & RABBANI, 2011; BROWNLEE, 2001; BEISSWENGER, 2013) e estes, por sua vez, podem ativar o RAGE (XUE et al., 2014). Considerando isso, após evidenciados os prejuízos cognitivos agudos e também após tratamentos repetidos, causados pelo MGO, foi utilizado o antagonista específico para RAGE, ZM1, em conjunto com o tratamento com MGO, de maneira a explorar o provável papel dos AGEs sobre as alterações comportamentais encontradas.

No tratamento de 11 dias com o ZM1, os animais foram testados para as memórias espacial, discriminativa e aversiva cobrindo o âmbito das memórias de trabalho, de curto e de longo prazo. Os animais foram tratados diariamente com ZM1, 30 min antes da injeção com o MGO. Os testes foram realizados 24 h após o tratamento com MGO. Os animais tratados unicamente com o ZM1 não exibiram quaisquer alterações motoras ou cognitivas. E quando em cotratamento com o MGO, os resultados revelaram que o ZM1 foi capaz de prevenir os déficits na memória de trabalho e na memória aversiva de curto prazo dos animais. Nesse sentido, foi demonstrado anteriormente que drogas que diminuem a sinalização de AGEs/RAGE, como o perindopril (que aumenta a forma solúvel do RAGE) e o alagebrium

(capaz de romper as ligações cruzadas dos AGEs), inibiram o declínio da memória de trabalho em ratos diabéticos, conforme avaliado no labirinto em (ZAKARIA et al., 2015).

No entanto, o ZM1 não foi capaz de evitar o prejuízo sobre a memória espacial de longo prazo nos animais. Apesar disso, os resultados sugerem a participação de AGEs na resposta ao tratamento com MGO, indicando um papel de destaque para a ação do RAGE sobre os prejuízos cognitivos observados no presente trabalho.

Além da formação de AGEs, estudos têm mostrado que o MGO é capaz de induzir danos oxidativos, alterações sobre vias bioquímicas e apoptose que podem prejudicar a função neuronal e a memória (CHOUDHARY et al., 1997; LOH et al., 2006; DASURI et al., 2013; KALAIPOS, 2008a; ALLAMAN et al., 2015; HANSEN et al., 2016). A metodologia do presente estudo, incluindo os protocolos de tratamento agudo e repetido, pode oferecer uma explicação temporal dos resultados aqui apresentados. Os AGEs recém-gerados pelo tratamento com MGO, poderiam estar envolvidos nos déficits cognitivos que foram observados. O MGO pode prontamente gerar adutos de hidroimidazolonas que podem se ligar ao RAGE (THORNALLEY, 2008; XUE et al., 2014). Como as proteínas modificadas por MGO presentes no plasma e demais tecidos podem se ligar ao RAGE, isso possibilita a ativação da resposta inflamatória mediada pela sinalização dependente do receptor, que pode estar associada a distúrbios de memória (HOFMANN et al., 1999; XUE et al., 2014; SCHMIDT et al., 1995; FANG et al., 2010). Dessa forma, uma vez que a ativação do RAGE modula positivamente a sua própria expressão, uma resposta inflamatória gerada periféricamente pelo MGO, através do tratamento de 11 dias, poderia amplificar seus efeitos, e dessa forma contribuir para a geração de danos cognitivos no SNC (SCHLEICHER & FRIESS, 2007).

Os efeitos do RAGE são intimamente dependentes do tipo de célula e das condições fisiológicas. A ativação do RAGE pode estar envolvida na homeostase tecidual e na regeneração após lesões (SORCI et al., 2013). No entanto, é conhecido que a ativação do RAGE pelos AGEs pode levar a dano oxidativo e à expressão gênica alterada (PALANISSAMI & PAUL, 2018; WAUTIER et al., 2001). É possível que a ativação do RAGE possa estar envolvida na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, uma vez que a expressão aumentada de RAGE pode ser encontrada na micróglia do encéfalo de pacientes com doença de Alzheimer, quando comparados com indivíduos saudáveis de mesma idade (YAN et al., 2009; FANG et al., 2010). Foi demonstrado também que a sobreexpressão do RAGE provoca neuroinflamação, aumento do acúmulo do peptídeo A β e prejuízos cognitivos em um modelo animal da doença de Alzheimer (FANG et al., 2010).

A microglia é crítica nas disfunções neuronais mediadas pelo peptídeo A β e importante na geração de respostas inflamatórias no SNC, as quais contribuem para o agravamento de processos neurodegenerativos (MANDREKAR & LANDRETH, 2010). A sobreexpressão de RAGE microglial em camundongos transgênicos expressando a proteína precursora amilóide humana (mAPP) mutante, implicada na patogênese do Alzheimer, aumentou a produção de mediadores pró-inflamatórios (interleucina 1 beta - IL-1 β e fator de necrose tumoral - TNF- α); também aumentou a infiltração da microglia e astrócitos, o acúmulo de A β , e acelerou o aparecimento de déficits na aprendizagem e memória espacial dos animais (FANG et al., 2010). Além disso, em um outro estudo, a aplicação de anticorpo contra RAGE reverteu os danos neuronais agravados por A β glicado pelo MGO em cultura primária de neurônios hipocâmpais (LI et al., 2013). Corroborando com esse raciocínio, em um caso diferente, a subexpressão de RAGE por β -asaronina foi associada à melhora nos déficits de memória de um modelo de rato duplo transgênico da doença de Alzheimer (YANG et al., 2016). Além disso, a subexpressão de RAGE e NF- κ B, pelo extrato de *Panax ginseng*, foi associada à proteção da memória espacial de longo prazo e da memória aversiva em um modelo de ratos induzidos por AGEs (TAN et al., 2015). Esses dados sugerem que, em um ambiente rico em A β , a ativação sustentada da microglia através de uma ativação elevada de RAGE causa distúrbios da homeostase, resultando na progressão e exacerbação de fatores que influenciam a gravidade da disfunção neuronal e prejuízos cognitivos (FANG et al., 2010; GONZALEZ-REYES & RUBIANO, 2018).

No presente trabalho, não foi investigado processos neurodegenerativos ou possíveis danos gerados por A β . No entanto, a prevenção completa dos déficits na memória de trabalho e na memória aversiva de curto prazo dos animais através do ZM1, sugere uma participação importante do RAGE como mediador de disfunções cognitivas geradas pelo MGO. Além disso, os resultados sugerem uma investigação mais aprofundada na via intracelular descendente do RAGE, em quadros de disfunção neuronal ou prejuízos cognitivos. De maneira a avaliar, por exemplo, o papel do NF κ B, expressão relativa de RAGE e a produção de mediadores pró-inflamatórios desencadeados por eventos de glicação (FANG et al., 2010).

8. CONCLUSÃO

- A partir dos resultados, conclui-se que a hipótese do presente trabalho foi confirmada no que tange o MGO estar associado a alterações deletérias *in vivo*, tanto a nível bioquímico quanto comportamental. E estas apresentaram severidades diferentes quanto ao regime de exposição, sendo agudo ou repetido;
- No entanto, as intervenções farmacológicas investigadas neste estudo, exploradas de modo a interromper as cadeias de sinalização intracelular ativadas pelo MGO ou direta ou indiretamente produzir efeitos compensatórios sobre possíveis alterações neuroquímicas deletérias causadas pelo mesmo, refletiram apenas no impedimento parcial dos prejuízos cognitivos gerados pelo MGO, os quais foram observados através de diferentes testes comportamentais;
- Em suma, no presente estudo foi observado que agudamente o MGO foi capaz de causar hipolocomoção de maneira dose-dependente em camundongos, condizente com estimulação GABAérgica;
- Porém, os parâmetros motores, como atividade locomotora espontânea, agilidade vertical, força e coordenação motora, assim como comportamento tipo-ansioso, não foram alterados pelo tratamento repetido com MGO;
- O MGO induziu déficits cognitivos na memória de curto e longo prazos, observando-se comprometimentos conforme a dose empregada, especialmente nas maiores doses repetidas investigadas (25 e 50 mg/kg). Esses efeitos foram detectados através de testes de memória de reconhecimento, memória espacial, memória aversiva e memória de trabalho;

- A avaliação neuroquímica indireta de danos oxidativos através da quantificação dos níveis de 4-HNE e MDA não revelou diferenças significativas após tratamento com MGO;
- Não foram encontradas alterações nos níveis de Glo2, NA, 5-HT no hipocampo e córtex pré-frontal, nem nos níveis de MGO no plasma, após o tratamento repetido com MGO;
- Entretanto, o MGO levou à diminuição de Glo1 principalmente no córtex pré-frontal dos animais, contribuindo para enfraquecimento da capacidade da sua detoxificação. Isso, portanto, corrobora os perigosos efeitos tóxicos do MGO *in vivo*;
- Foram também detectados níveis de DA reduzidos no córtex pré-frontal dos animais, após tratamento repetido com MGO. Isso sugere possíveis novos efeitos e mecanismos de ação do MGO no SNC, capaz de agir sobre o sistema dopaminérgico e a sua influência sobre a memória de trabalho, bem como, sobre processos cognitivos ligados à inteligência fluída em humanos;
- Assim, o córtex pré-frontal parece ser uma estrutura vulnerável ao MGO *in vivo*, uma vez que o mesmo diminuiu os níveis da principal enzima do seu sistema de detoxificação celular (Glo1) e os níveis do neurotransmissor DA;
- O cotratamento do MGO com bupropiona, cetamina, muscimol, bicuculina ou ZM1 não evitaram de maneira completa os prejuízos cognitivos causados pelo MGO. Bupropiona, cetamina, muscimol e ZM1 foram capazes de impedir parcialmente o déficit sobre o desempenho da memória de trabalho observada no teste de alternância espontânea;

- O ZM1, um antagonista do receptor de AGEs (RAGE), foi capaz de prevenir os déficits causados pelo MGO sobre a memória de trabalho e a memória aversiva de curto prazo. Entretanto, o ZM1 não evitou os prejuízos sobre a memória espacial de longo prazo causados pelo MGO nos animais;
- Os resultados do cotratamento do ZM1 com o MGO sugerem a participação dos AGEs nos prejuízos cognitivos causados pelo MGO e o bloqueio do RAGE como um importante alvo terapêutico a ser usado visando a restauração de déficits cognitivos causados pelo estresse dicarbonílico.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Além de um estudo dos efeitos do MGO sobre a homeostase da DA no SNC, outro ponto interessante a ser melhor investigado é sobre os receptores para DA. Os receptores de dopamina das classes D1 e D2 são altamente distribuídos em neurônios dopaminérgicos e não dopaminérgicos, em várias regiões do SNC de mamíferos (BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011; ANZALONE et al., 2012). Os níveis de DA e a expressão de seus receptores, bem como sua atividade regionalmente dependente, são críticos para a plasticidade neuronal e as funções cognitivas (JAY, 2003; DALLEY & EVERITT, 2009).

Uma vez que através deste trabalho os déficits na memória de trabalho observados sugerem estar associados a uma depleção nos níveis de DA no córtex pré-frontal, e que a bupropiona, cetamina, muscimol e ZM1 foram capazes de restaurar parcialmente estes déficits, seria pertinente medir os níveis de monoaminas após o cotratamento dessas drogas com o MGO. Para que assim, a importância do sistema dopaminérgico sobre os efeitos cognitivos causados pelo MGO seja melhor compreendida. Além disso, após observado que o antagonismo de RAGE proporcionou efeitos benéficos, seria de interesse investigar a via de sinalização intracelular dependente do RAGE, avaliando a ativação do NFκB, expressão de RAGE e mediadores pró-inflamatórios (FANG et al., 2010).

Considerando que em modelo de células HT22 de hipocampo de camundongos, o MGO diminuiu os níveis de Glo2 que foram mediados por autofagia (DAFRE et al., 2017), seria, portanto, importante investigar se a autofagia também é induzida pelo MGO em modelos animais.

Os resultados em parâmetros de memória, obtidos através do protocolo experimental de administrações repetidas com MGO, também sugerem que o mesmo possa ser utilizado, não somente para estudos futuros em relação aos mecanismos de ação do MGO, mas também explorado como um possível modelo animal para o estudo de demência ou comprometimento cognitivo leve (MCI). Além disso, o uso de inibidores da Glo1, como estratégia clínica, deve ser contrabalanceado pelos possíveis efeitos cognitivos negativos causados por um aumento do MGO no organismo.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC)



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Mecanismos de ação do metilglioxal, uma toxina endógena", protocolada sob o CEUA nº 7245210616, sob a responsabilidade de **Alcir Luiz Dafre e equipe; Barbara dos Santos; Gudrian Ricardo Lopes de Almeida; Jozimar Carlos Szczepanik** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 07/10/2016.

We certify that the proposal "Action mechanisms of methylglyoxal, an endogenous toxin", utilizing 1200 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 7245210616, under the responsibility of **Alcir Luiz Dafre and team; Barbara dos Santos; Gudrian Ricardo Lopes de Almeida; Jozimar Carlos Szczepanik** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 10/07/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2016 a 04/2020** Área: **Bioquímica**

Origem: **CCB - Biotério de Roedores e animais aquáticos do Labdef**

Espécie: **Camundongos heterogênicos** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **60 a 120 dias** N: **1200**

Linhagem: **Swiss** Peso: **25 a 50 g**

Resumo: Existe forte correlação entre o mal funcionamento sistema de degradação do metilglioxal (MGO) e o desenvolvimentos da doença neurodegenerativas. O Metilglioxal (MG) é um alfa-cetoaldeído de três carbonos formado por diferentes rotas metabólicas, sendo a glicólise a principal delas. O cérebro dos pacientes com a doença de Alzheimer apresentam elevados níveis de produtos avançados de glicação (AGE), menores níveis de glutathione e estresse oxidativo, os quais são estritamente correlacionados como os níveis de MGO. Recentemente, mostrou-se que a proteína DJ-1 possui atividade glyoxalase, e a ausência desta atividade tem sido considerada como uma das causas de uma doença autossomal rara da doença de Parkinson. Além disto, o envelhecimento está associado a uma menor expressão da glicoxalase 1 (Glo1) em roedores e humanos. Estes exemplos realçam a relevância em se descobrir novos mecanismo de toxicidade do MGO. Por outro lado, em células HT22, o MGO modula a via o fator de transcrição Nrf2, induzindo a expressão de defesas antioxidantes. Diversos estudos tem identificado a associação entre a expressão da Glo1 e fenótipos comportamentais em várias linhagens de camundongos. As evidências de alterações na expressão de Glo1 ou que níveis de MG estariam associados a modulação do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo em roedores. Sendo assim, propomos um aprofundamento nos estudos dos mecanismo de ação do MGO, envolvendo processos autofágicos.

Local do experimento: Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC

Florianópolis, 07 de outubro de 2016

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Aderbal Silva Aguiar Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

REFERÊNCIAS

AHMED, N.; AHMED, U.; THORNALLEY, P. J.; HAGER, K.; FLEISCHER, G.; MÜNCH, G.; Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. **Journal of Neurochemistry**, v. 92, n. 2, 255-263, 2005.

AHMED, N.; DOBLER, D.; DEAN, M.; THORNALLEY, P. J.; Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5724-5732, 2005b.

ALLAMAN, I.; BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J.; Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 23, 2015.

ANDERSSON, D. A.; GENTRY, C.; LIGHT, E.; VASTANI, N.; VALLORTIGARA, J.; BIERHAUS, A.; FLEMING, T.; BEVAN, S.; Methylglyoxal evokes pain by stimulating TRPA1. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77986, 2013.

ANGELONI, C.; ZAMBONIN, L.; HRELIA, S.; Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, v. 2014, p. e238485, 2014.

ANZALONE, A.; LIZARDI-ORTIZ, J. E.; RAMOS, M.; DE MEI, C.; HOPF, F. W.; IACCARINO, C.; HALBOUT, B.; JACOBSEN, J.; KINOSHITA, C.; WELTER, M.; CARON, M. G.; BONCI, A.; SULZER, D.; BORRELLI, E.; Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 26, p. 9023-9034, 2012.

ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N.; Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 1, p. 206-211, 2009.

AU, B.; DALE-MCGRATH, S.; TIERNEY, M. C.; Sex differences in the prevalence and incidence of mild cognitive impairment: A meta-analysis. **Ageing Research Reviews**, v. 35, p. 176-199, 2017.

AUGER, M. L.; FLORESCO, S. B.; Prefrontal cortical GABA modulation of spatial reference and working memory. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 2, pii: pyu013, 2014.

BADDELEY, A. D.; THOMSON, N.; BUCHANAN, M.; Word length and the structure of short-term memory. **Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior**, v. 14, p. 575-589, 1975.

BAUNE, B. T.; RENGER, L.; Pharmacological and non-pharmacological interventions to improve cognitive dysfunction and functional ability in clinical depression--a systematic review. **Psychiatry Research**, v. 219, n. 1, p. 25-50, 2014.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R.; The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 182-217, 2011.

BEERI, M. S.; MOSHIER, E.; SCHMEIDLER, J.; GODBOLD, J.; URIBARRI, J.; REDDY, S.; SANO, M.; GROSSMAN, H. T.; CAI, W.; VLASSARA, H.; SILVERMAN, J. M.; Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 11-12, p. 583-587, 2011.

BEISSWENGER, P. J.; HOWELL, S. K.; RUSSELL, G. B.; MILLER, M. E.; RICH, S. S.; MAUER, M.; Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. **Diabetes Care**, v. 36, n. 10, p. 3234-3239, 2013.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; BDNF and memory formation and storage. **The Neuroscientist**, v. 14, n. 2, p. 147-156, 2008.

BELZUNG, C.; Measuring rodent exploratory behavior. Em: CRUSIO, W. E.; GERLAI, R. T. (Editores); Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research (techniques in the behavioral and neural sciences). **Elsevier**, Amsterdam, p. 738-749, 1999.

BIERHAUS, A.; FLEMING, T.; STOYANOV, S.; LEFFLER, A.; BABES, A.; NEACSU, C.; SAUER, S. K.; EBERHARDT, M.; SCHNÖLZER, M.; LASITSCHKA, F.; NEUHUBER, W. L.; KICHKO, T. I.; KONRADE, I.; ELVERT, R.; MIER, W.; PIRAGS, V.; LUKIC, I. K.; MORCOS, M.; DEHMER, T.; RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J.; EDELSTEIN, D.; NAU, C.; FORBES, J.; HUMPERT, P. M.; SCHWANINGER, M.; ZIEGLER, D.; STERN, D. M.; COOPER, M. E.; HABERKORN, U.; BROWNLEE, M.; REEH, P. W.; NAWROTH, P. P.; Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 926-933, 2012.

BIESSELS, G. J.; STAEKENBORG, S.; BRUNNER, E.; BRAYNE, C.; SCHELTENS, P.; Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. **The Lancet Neurology**, v. 5, p. 64-74, 2006.

BJÖRKLUND, A.; DUNNETT, S. B.; Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 194-202, 2007.

BOLFER, C.; PACHECO, S. P.; TSUNEMI, M. H.; CARREIRA, W. S.; CASELLA, B. B.; CASELLA, E. B.; Attention-deficit/hyperactivity disorder: the impact of methylphenidate on working memory, inhibition capacity and mental flexibility. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 75, n. 4, p. 204-208, 2017.

BORA, E.; AKDEDE, B. B.; ALPTEKIN, K.; The relationship between cognitive impairment in schizophrenia and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Psychological Medicine**, v. 47, n. 6, p. 1030-1040, 2017.

BORDONE, M. P.; SALMAN, M. M.; TITUS, H. E.; AMINI, E.; ANDERSEN, J. V.; CHAKRABORTI, B.; DIUBA, A. V.; DUBOUSKAYA, T. G.; EHRKE, E.; ESPINDOLA DE FREITAS, A.; BRAGA DE FREITAS, G.; GONÇALVES, R. A.; GUPTA, D.; GUPTA, R.; HA, S. R.; HEMMING, I. A.; JAGGAR, M.; JAKOBSEN, E.; KUMARI, P.; LAKKAPPA, N.; MARSH, A. P. L.; MITLÖHNER, J.; OGAWA, Y.; KUMAR, P. R.; RIBEIRO, F. C.; SALAMIAN, A.; SALEEM, S.; SHARMA, S.; SILVA, J. M.; SINGH, S.; SULAKHIYA, K.; TEFERA, T. W.; VAFADARI, B.; YADAV, A.; YAMAZAKI, R.; SEIDENBECHER, C. I.; The energetic brain - A review from students to students. **Journal of Neurochemistry**, v. 151, n. 2, p. 139-165, 2019.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRALEY, A.; KWAK, T.; JULES, J.; HARJA, E.; LANDGRAF, R.; HUDSON, B. I.; Regulation of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Ectodomain Shedding and Its Role in Cell Function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 23, p. 12057-12073, 2016.

BRIONI, J. D.; MCGAUGH, J. L.; Post-training administration of GABAergic antagonists enhances retention of aversively motivated tasks. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 96, 4, p. 505-510, 1988.

BROUWERS, O.; NIESSEN, P. M.; FERREIRA, I.; MIYATA, T.; SCHEFFER, P. G.; TEERLINK, T.; SCHRAUWEN, P.; BROWNLEE, M.; STEHOUWER, C. D.; SCHALKWIJK, C. G.; Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1374-1380, 2011.

BROWNLEE, M.; Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**; v. 414, n. 6865, p. 813–820, 2001.

CAI, Z.; LIU, N.; WANG, C.; QIN, B.; ZHOU, Y.; XIAO, M.; CHANG, L.; YAN, L. J.; ZHAO, B.; Role of RAGE in Alzheimer's Disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 4, p. 483-495, 2016.

CARMACK, S. A.; BLOCK, C. L.; HOWELL, K. K.; ANAGNOSTARAS, S. G.; Methylphenidate enhances acquisition and retention of spatial memory. **Neuroscience Letters**, v. 567, p. 45-50, 2014.

CHANG, Y. C.; COLE, T. B.; COSTA, L. G.; Behavioral Phenotyping for Autism Spectrum Disorders in Mice. **Current Protocols in Toxicology**, 72: 11.22.1–11.22.21, 2017.

CHOUDHARY, D.; CHANDRA, D.; KALE, R. K.; Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. **Toxicology Letters**, v. 93, n. 2-3, p. 141-152, 1997.

CHAO, O. Y.; PUM, M. E.; HUSTON, J. P.; The interaction between the dopaminergic forebrain projections and the medial prefrontal cortex is critical for memory of objects: implications for Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 247, p. 373-382, 2013.

CHUA, H. C.; CHEBIB M.; GABAA Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 79, p. 01-34, 2017.

CHUN, H. J.; LEE, Y.; KIM, A. H.; LEE, J.; Methylglyoxal causes cell death in neural progenitor cells and impairs adult hippocampal neurogenesis. **Neurotoxicity Research**, v. 29, n. 3, p. 419-431, 2016.

ÇIÇEK, S. S.; Structure-Dependent Activity of Natural GABA(A) Receptor Modulators. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 7, p. E1512, 2018.

CLUGSTON, S. L.; BARNARD, J. F.; KINACH, R.; MIEDEMA, D.; RUMAN, R.; DAUB, E.; HONEK, J. F.; Overproduction and characterization of a dimeric non-zinc glyoxalase I from *Escherichia coli*: evidence for optimal activation by nickel ions. **Biochemistry**, v. 37, n. 24, p. 8754-8763, 1998.

COOLS, R.; The costs and benefits of brain dopamine for cognitive control. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 7, n. 5, p. 317-329, 2016.

COOPER, R. A.; ANDERSON, A.; The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, v. 11, n. 4, p. 273-276, 1970.

COWAN, N.; What are the differences between long-term, short-term, and working memory?. **Progress in Brain Research**, v. 169, p. 323–338, 2008.

CRIPPA, A.; DEL VECCHIO, G.; BUSTI CECCARELLI, S.; NOBILE, M.; ARRIGONI, F.; BRAMBILLA, P.; Cortico-Cerebellar Connectivity in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know So Far?. **Frontiers in Psychiatry**, v. 7, n. 20, 2016.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A.; The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 571-625, 2005.

CUNHA, M. P.; PAZINI, F. L.; ROSA, J. M.; RAMOS-HRYB, A. B.; OLIVEIRA, Á.; KASTER, M. P.; RODRIGUES, A. L.; Creatine, similarly to ketamine, affords antidepressant-like effects in the tail suspension test via adenosine A₁ and A_{2A} receptor activation. **Purinergic Signalling**, v. 11, n. 2, p. 215-227, 2015.

DAFRE, A. L.; GOLDENBERG, J.; WANG, T.; SPIEGEL, D. A.; MAHER, P.; Methylglyoxal, the foe and friend of glyoxalase and Trx/TrxR systems in HT22 nerve cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 89, p. 08-19, 2015.

DAFRE, A. L.; SCHMITZ, A. E.; MAHER, P.; Methylglyoxal-induced AMPK activation leads to autophagic degradation of thioredoxin 1 and glyoxalase 2 in HT22 nerve cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 108, p. 270-279, 2017.

DALLEY, J. W.; EVERITT, B. J.; Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 4, p. 403-410, 2009.

DASH, S. K.; Cognitive impairment and diabetes. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 155-165, 2013.

DASURI, K.; ZHANG, L.; KELLER, J. N.; Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 62, p. 170-185, 2013.

DE LA MONTE, S. M.; Relationships between diabetes and cognitive impairment. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 245-267, 2014.

DEACON, R.M.; Measuring motor coordination in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 75, p. e2609, 2013.

DEANE, R.; SINGH, I.; SAGARE, A. P.; BELL, R. D.; ROSS, N. T.; LARUE, B.; LOVE, R.; PERRY, S.; PAQUETTE, N.; DEANE, R. J.; THIYAGARAJAN, M.; ZARCONE, T.; FRITZ, G.; FRIEDMAN, A. E.; MILLER, B. L.; ZLOKOVIC, B. V.; A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1377-1392, 2012.

DEGEN, J.; VOGEL, M.; RICHTER, D.; HELLWIG, M.; HENLE, T.; Metabolic transit of dietary methylglyoxal. Metabolic transit of dietary methylglyoxal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 43, p. 10253-10260, 2013.

DEMBER, W. N.; FOWLER, H.; Spontaneous alternation behavior. **Psychological Bulletin**, v. 55, p. 412-428, 1958.

DENG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; XIAO, S.; SONG, D. QING, H.; LI, Q.; RAJPUT, A. H.; Occurrence and distribution of salsolinol-like compound, 1-acetyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (ADTIQ) in parkinsonian brains. **Journal of Neural Transmission (Vienna)**, v. 119, n. 4, p. 435-441, 2012.

DESAI, K. M.; CHANG, T.; WANG, H.; BANIGESH, A.; DHAR, A.; LIU, J.; UNTEREINER, A.; WU, L.; Oxidative stress and aging: Is methylglyoxal the hidden enemy?. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 273-284, 2010.

DI LORETO, S.; ZIMMITTI, V.; SEBASTIANI, P.; CERVELLI, C.; FALONE, S.; AMICARELLI, F.; Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 2, p. 245-257, 2008.

DISTLER, M. G.; PLANT, L. D.; SOKOLOFF, G.; HAWK, A. J.; ANEAS, I.; WUENSCHHELL, G. E.; TERMINI, J.; MEREDITH, S. C.; NOBREGA, M. A.; PALMER, A. A.; Glyoxalase 1 increases anxiety by reducing GABAA receptor agonist methylglyoxal. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2306-2315, 2012a.

DISTLER, M. G.; PALMER, A. A.; Role of glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. **Frontiers in Genetics**, v. 3, 2012b.

DISTLER, M. G.; GORFINKLE, N.; PAPALE, L. A.; WUENSCHHELL, G. E.; TERMINI, J.; ESCAYG, A.; WINAWER, M. R.; PALMER, A. A.; Glyoxalase 1 and its substrate methylglyoxal are novel regulators of seizure susceptibility. **Epilepsia**, v. 54, n. 4, p. 649-657, 2013.

DMITRIEV, L. F.; TITOV, V. N.; Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 200-210, 2010.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G.; The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Journal of the International Association for the Study of Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-174, 1977.

EICHENBAUM, H.; Prefrontal-hippocampal interactions in episodic memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 547-558, 2017.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR.; FEATHER-STONE, R. M.; A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**; v. 7; p. 88-95; 1961.

ENGLE, R. W.; TUHOLSKI, S. W.; LAUGHLIN, J. E.; CONWAY, A. R.; Working memory, short-term memory, and general fluid intelligence: a latent-variable approach. **Journal of Experimental Psychology: General**, v. 128, n. 3, p. 309-331, 1999.

FANG, F.; LUE, L. F.; YAN, S.; XU, H.; LUDDY, J. S.; CHEN, D.; WALKER, D. G.; STERN, D. M.; YAN, S.; SCHMIDT, A. M.; CHEN, J. X.; YAN, S. S.; RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, A β accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 4, p. 1043-1055, 2010.

FARAONE, S. V.; The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 87, 255-270, 2018.

FAVA, M.; RUSH, A. J.; THASE, M. E.; CLAYTON, A.; STAHL, S. M.; PRADKO, J. F.; JOHNSTON, J. A.; 15 years of clinical experience with bupropion HCl: from bupropion to bupropion SR to bupropion XL. **Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 7, n. 3, p. 106-113, 2005.

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.; SCAZUFCA, M.; Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **The Lancet**, v. 366, n. 9503, p. 2112-2117, 2005.

FLEMING, S. M.; SALCEDO, J.; FERNAGUT, P. O.; ROCKENSTEIN, E.; MASLIAH, E.; LEVINE, M. S.; CHESSELET, M. F.; Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9434-9440, 2004.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E.; Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

FORD, C. P.; The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. **Neuroscience**, v. 282, p. 13-22, 2014.

FUERMAIER, A. B.; TUCHA, L.; KOERTS, J.; WEISBROD, M.; LANGE, K. W.; ASCHENBRENNER, S.; TUCHA, O.; Effects of methylphenidate on memory functions of adults with ADHD. **Applied Neuropsychology: Adult**, v. 24, n. 3, p. 199-211, 2017.

FUSTER, J. M.; Distributed memory for both short and long term. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 70, n. 1-2, p. 268-274, 1998.

GARDONI, F.; BELLONE, C.; Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. 25, eCollection, 2015.

GENG, X.; MA, J.; ZHANG, F.; XU, C.; Glyoxalase I in tumor cell proliferation and survival and as a potential target for anticancer therapy. **Oncology Research and Treatment**, v. 37, n. 10, p. 570-574, 2014.

GHOSH, M.; TALUKDAR, D.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, N.; RAY, M.; RAY, S.; In vivo assessment of toxicity and pharmacokinetics of methylglyoxal. Augmentation of the curative effect of methylglyoxal on cancer-bearing mice by ascorbic acid and creatine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, n. 1, p. 45-58, 2006.

GOLD, P. E.; MCGAUGH, J. L.; A single-trace, two-process view of memory storage processes. Em: Deutsch, D.; Deutsch, J. A.; (Editores); Short-term Memory. **Academic Press**. New York, p. 355-378, 1975.

GÓMEZ, M. C.; REDOLAT, R.; CARRASCO M. C.; Differential effects of bupropion on acquisition and performance of an active avoidance task in male mice. **Behavioural Processes**, v. 124, p. 32-37, 2016.

GONZALEZ-REYES, R. E.; RUBIANO, M. G.; Astrocyte's RAGE: More Than Just a Question of Mood. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2018.

GOLEJ, J.; HOEGER, H.; RADNER, W.; UNFRIED, G.; LUBEC, G.; Oral administration of methylglyoxal leads to kidney collagen accumulation in the mouse. **Life Sciences**, v. 63, n. 9, p. 801-807, 1998.

GRAY, S.; GREEN, S.; ALT, M.; HOGAN, T. P.; KUO, T.; BRINKLEY, S.; COWAND, N.; The Structure of Working Memory in Young Children and Its Relation to Intelligence. **Journal of Memory and Language**, v. 92, p. 183–201, 2017.

GÜEMES, M.; RAHMAN, S. A.; HUSSAIN, K.; What is a normal blood glucose?. **Archives of Disease in Childhood**, v. 101, n. 6, p. 569-574, 2016.

HABLITZ, J. J.; MATHEW, S. S.; POZZO-MILLER, L.; GABA vesicles at synapses: are there 2 distinct pools?. **The Neuroscientist**, v. 15, n. 3, p. 218-224, 2009.

HÅKANSSON, K.; LEDREUX, A.; DAFFNER, K.; TERJESTAM, Y.; BERGMAN, P.; CARLSSON, R.; KIVIPELTO, M.; WINBLAD, B.; GRANHOLM, A. C.; MOHAMMED, A. K.; BDNF Responses in Healthy Older Persons to 35 Minutes of Physical Exercise, Cognitive Training, and Mindfulness: Associations with Working Memory Function. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 55, n. 2, p. 645-657, 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molecular Aspects of Medicine**; v. 8, n. 2, p. 89-193, 1985.

HAMBSCH, B.; CHEN, B. G.; BRENNDÖRFER, J.; MEYER, M.; AVRABOS, C.; MACCARRONE, G.; LIU, R. H.; EDER, M.; TURCK, C. W.; LANDGRAF, R.; Methylglyoxal-mediated anxiety involves increased protein modification and elevated expression of glyoxalase 1 in the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 5, p. 1240-1251, 2010.

HAMBSCH, B.; Altered glyoxalase 1 expression in psychiatric disorders: cause or consequence?. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 3, p. 302–308, 2011.

HAMOUDANE, M.; AMAKRAN, A.; BAKRIM, N.; NHIRI, M.; Decreased blood levels of glyoxalase I and diabetic complications. **International Journal of Diabetes in Developing Countries**, v. 35, n. 3, p. 496–501, 2015.

HANSEN, F.; PANDOLFO, P.; GALLAND, F.; TORRES, F. V.; DUTRA, M. F.; BATASSINI, C.; GUERRA, M. C.; LEITE, M. C.; GONÇALVES, C. A.; Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. **Physiology & Behavior**, v. 164 (Pt A), p. 093-101, 2016.

HARRIS, J.J.; JOLIVET, R.; ATTWELL, D.; Synaptic energy use and supply. **Neuron**, v. 75, n. 5, p. 762-777, 2012.

HARTLEY, T.; LEVER, C.; BURGESS, N.; O'KEEFE, J.; Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1635, p. 20120510, 2013.

HEAL, D. J.; SMITH, S. L.; GOSDEN, J.; NUTT, D. J.; Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 479-496, 2013.

HIPKISS, A. R.; On the Relationship between Energy Metabolism, Proteostasis, Aging and Parkinson's Disease: Possible Causative Role of Methylglyoxal and Alleviative Potential of Carnosine. **Aging and Disease**, v. 8, n. 3, p. 334-345, 2017.

HITCHCOTT, P. K.; HARMER, C. J.; PHILLIPS, G. D.; Enhanced acquisition of discriminative approach following intra-amygdala d-amphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 132, n. 3, p. 237-246, 1997.

HOFMANN, M. A.; DRURY, S.; FU, C.; QU, W.; TAGUCHI, A.; LU, Y.; AVILA, C.; KAMBHAM, N.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.; NEURATH, M. F.; SLATTERY, T.; BEACH, D.; MCCLARY, J.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; STERN, D.;

SCHMIDT, A. M.; RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell**, v. 97, n. 7, p. 889-901, 1999.

HONG, Y.; SHEN, C.; YIN, Q.; SUN, M.; MA, Y.; LIU, X.; Effects of RAGE-Specific Inhibitor FPS-ZM1 on Amyloid- β Metabolism and AGEs-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Rat Hippocampus. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 5, p. 1192-1199, 2016.

HOVATTA, I.; TENNANT, R. S.; HELTON, R.; MARR, R. A.; SINGER, O.; REDWINE, J. M.; ELLISON, J. A.; SCHADT, E. E.; VERMA, I. M.; LOCKHART, D. J.; BARLOW, C.; Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. **Nature**, v. 438, n. 7068, 662-666, 2005.

HUANG, X.; WANG, F.; CHEN, W.; CHEN, Y.; WANG, N.; VON MALTZAN, K.; Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. **Brain Research**, v. 1469, p. 82-91, 2012.

HUDSON, B. I.; KALEA, A. Z.; DEL MAR ARRIERO, M.; HARJA, E.; BOULANGER, E.; D'AGATI, V.; SCHMIDT, A. M.; Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34457–34468, 2008.

HUNSKAAR, S.; HOLE K.; The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Journal of the International Association for the Study of Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

HYDER, F.; ROTHMAN, D. L.; BENNETT, M. R.; Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 110, n. 9, p. 3549-3554, 2013.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends in Pharmacological Sciences**; v. 12; n. 7, p. 260-265; 1991.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I.; Memória. Porto Alegre. **Artmed**, 2002.

IZQUIERDO, I.; MYSKIW, J.; BENETTI, F.; FURINI, C.; Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. São Paulo. **Revista USP**, ed. 9, 2013.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R.; MYSKIW, J. C.; Fear memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 695-750, 2016.

JANG, S.; KWON, D. M.; KWON, K.; PARK, C.; Generation and characterization of mouse knockout for glyoxalase 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 490, n. 2, p. 460-465, 2017.

JASH, K.; GONDALIYA, P.; KIRAVE, P.; KULKARNI, B.; SUNKARIA, A.; KALIA, K.; Cognitive dysfunction: A growing link between diabetes and Alzheimer's disease. **Drug Development Research**, doi: 10.1002/ddr.21579, 2019.

JAY, T. M.; Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 69, n. 6, p. 375-390, 2003.

JENKINS, T. A.; AMIN, E.; PEARCE, J. M.; BROWN, M. W.; AGGLETON, J. P.; Novel spatial arrangements of familiar visual stimuli promote activity in the rat hippocampal formation but not the parahippocampal cortices: a c-fos expression study. **Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 43-52, 2004.

JOHNSON, L. R.; BATTLE, A. R.; MARTINAC, B.; Remembering Mechanosensitivity of NMDA Receptors. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. 533, 2019.

JOHNSTON, G. A.; GABA(A) receptor channel pharmacology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 15, p. 1867-1885, 2005.

JOHNSTON, G. A. R.; Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 328-336, 2013.

JOHNSTON G. A.; Muscimol as an ionotropic GABA receptor agonist. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 10, p. 1942-1947, 2014.

JUÁREZ OLGUÍN, H.; CALDERÓN GUZMÁN, D.; HERNÁNDEZ GARCÍA, E.; BARRAGÁN MEJÍA, G.; The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 9730467, 2016.

JUNAID, M. A.; KOWAL, D.; BARUA, M.; PULLARKAT, P. S.; SKLOWER BROOKS, S.; PULLARKAT, R. K.; Proteomic studies identified a single nucleotide polymorphism in glyoxalase I as autism susceptibility factor. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 131, n. 1, p. 11-17, 2004.

KALAIPOS, M. P.; SCHAFF, Z.; GARZÓ, T.; ANTONI, F.; MANDL, J.; Accumulation of phenols in isolated hepatocytes after pretreatment with methylglyoxal. **Toxicology Letters**, v. 58, n. 2, p. 181-191, 1991.

KALAPOPOS, M. P.; Methylglyoxal toxicity in mammals. **Toxicology Letters**, v. 73, n. 1, p. 03-24, 1994.

KALAPOPOS, M. P.; Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicology Letters**, v. 110, n. 3, p. 145–175, 1999.

KALAPOPOS, M. P.; Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 23, n. 1-2, p. 69-91, 2008a.

KALAPOPOS, M. P.; The tandem of free radicals and methylglyoxal. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 3, p. 251-271, 2008b.

KALAPOPOS, M. P.; Where does plasma methylglyoxal originate from?. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 99, n. 3, p. 260-271, 2013.

KALIA, L. V.; LANG, A. E.; Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896-912, 2015.

KALKSTEIN, S.; HURFORD, I.; GUR, R. C.; Neurocognition in schizophrenia. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 4, p. 373-390, 2010.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K. C.; GRAYBIEL, A. M.; FENTRESS, J. C.; Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45-59, 2016.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R.; The molecular and systems biology of memory. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 163-186, 2014.

KAY, A. M.; SIMPSON, C. L.; STEWART, J. A. Jr.; The Role of AGE/RAGE Signaling in Diabetes-Mediated Vascular Calcification. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, n. 6809703, 2016.

KAZDOBA, T. M.; LEACH, P. T.; CRAWLEY, J. N.; Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 15, n. 1, p. 07-26, 2016.

KLESCHEVNIKOV, A. M.; YU, J.; KIM, J.; LYSENKO, L. V.; ZENG, Z.; YU, Y. E.; MOBLEY, W. C.; Evidence that increased *Kcnj6* gene dose is necessary for deficits in behavior and dentate gyrus synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. **Neurobiology of Disease**, v. 103, p. 01-10, 2017.

KNAPP, L. T.; KLANN, E.; Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory?. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, n. 1, p. 1-7, 2002.

KODL, C. T.; SEAQUIST, E. R.; Cognitive Dysfunction and Diabetes Mellitus. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 4, p. 494-511, 2008.

KOIKE, S.; ANDO, C.; USUI, Y.; KIBUNE, Y.; NISHIMOTO, S.; SUZUKI, T.; OGASAWARA, Y.; Age-related alteration in the distribution of methylglyoxal and its metabolic enzymes in the mouse brain. **Brain Research Bulletin**, v. 144, p. 164-170, 2019.

KOIVISTO, A.; CHAPMAN, H.; JALAVA, N.; KORJAMO, T.; SAARNILEHTO, M.; LINDSTEDT, K.; PERTOVAARA, A.; TRPA1: a transducer and amplifier of pain and inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 50-55, 2014.

KONG, X.; MA, M. Z.; HUANG, K.; QIN, L.; ZHANG, H. M.; YANG, Z.; LI, X. Y.; SU, Q.; Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes 2. **Journal of Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 535-540, 2014.

KOOP, D. R.; CASAZZA, J. P.; Identification of ethanol-inducible P-450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes. **Journal of Chemical Biology**, v. 260, n. 25, p. 13607-13612, 1985.

KOPF, D.; FROLICH, L.; Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, p. 677-685, 2009.

KOSCHINSKY, T.; HE, C. J.; MITSUHASHI, T.; BUCALA, R.; LIU, C.; BUENTING, C.; HEITMANN, K.; VLASSARA, H.; Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 12, p. 6474-6479, 1997.

KOVAČ, J.; PODKRAJŠEK, K. T.; LUKŠIČ, M. M.; BATTELINO, T.; Weak association of glyoxalase 1 (GLO1) variants with autism spectrum disorder. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 75-82, 2015.

KRÖMER, S. A.; KESSLER, M. S.; MILFAY, D.; BIRG, I. N.; BUNCK, M.; CZIBERE, L.; PANHUYSSEN, M.; PÜTZ, B.; DEUSSING, J. M.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R.; TURCK, C. W.; Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4375-4384, 2005.

KUHLA, B.; LÜTH, H. J.; HAFERBURG, D.; BOECK, K.; ARENDT, T.; MÜNCH, G.; Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 211-216, 2005.

KULLMANN, D. M.; RUIZ, A.; RUSAKOV, D. M.; SCOTT, R.; SEMYANOV, A.; WALKER, M. C.; Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why?. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 87, n. 1, p. 33-46, 2005.

LANGE, K. W.; ROBBINS, T. W.; MARSDEN, C. D.; JAMES, M.; OWEN, A. M.; PAUL, G. M.; L-dopa withdrawal in Parkinson's disease selectively impairs cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 107, n. 2-3, p. 394-404, 1992.

LEE, J. Y.; SONG, J.; KWON, K.; JANG, S.; KIM, C.; BAEK, K.; KIM, J.; PARK, C.; Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 14, p. 3215-3225, 2012.

LI, X. H.; DU, L. L.; CHENG, X. S.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; LV, B. L.; LIU, R.; WANG, J. Z.; ZHOU, X. W.; Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid. **Cell Death & Disease**, v. 4, e673, 2013.

LI, D.; LEI, C.; ZHANG, S.; ZHANG, S.; LIU, M.; WU, B.; Blockade of high mobility group box-1 signaling via the receptor for advanced glycation end-products ameliorates inflammatory damage after acute intracerebral hemorrhage. **Neuroscience Letters**, v. 609, p. 109-119, 2015.

LIAN, Y. J.; GONG, H.; WU, T. Y.; SU, W. J.; ZHANG, Y.; YANG, Y. Y.; PENG, W.; ZHANG, T.; ZHOU, J. R.; JIANG, C. L.; WANG, Y. X.; Ds-HMGB1 and fr-HMGB induce depressive behavior through neuroinflammation in contrast to nonoxid-HMGB1. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 59, p. 322-332, 2017.

LISMAN, J. E.; OTMAKHOVA, N. A.; Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. **Hippocampus**, v. 11, n. 5, p. 551-568, 2001.

LISMAN, J. E.; GRACE, A. A.; The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron**, v. 46, n. 5, p. 703-713, 2005.

LO, T. W.; WESTWOOD, M. E.; MCLELLAN, A. C.; SELWOOD, T.; THORNALLEY, P. J.; Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 51, p. 32299-32305, 1994.

LOH, K. P.; HUANG, S. H.; DE SILVA, R.; TAN, B. K.; ZHU, Y. Z.; Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. **Current Alzheimer Research**, v. 3, n. 4, p. 327-337, 2006.

LYLES, G. A.; CHALMERS, J.; The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1409-1414, 1992.

MANDREKAR, S.; LANDRETH, G. E.; Microglia and Inflammation in Alzheimer's Disease. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 156-167, 2010.

MATAFOME, P.; SENA, C.; SEIÇA, R.; Methylglyoxal, obesity, and diabetes. **Endocrine**, v. 43, n. 3, p. 472-484, 2013.

MATHEUS, F. C.; RIAL, D.; REAL, J. I.; LEMOS, C.; BEN, J.; GUAITA, G. O.; PITA, I. R.; SEQUEIRA, A. C.; PEREIRA, F. C.; WALZ, R.; TAKAHASHI, R. N.; BERTOGLIO, L. J.; DA CUNHA, C.; CUNHA, R. A.; PREDIGER, R. D.; Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 43-54, 2016.

MATHIS, V.; BARBELIVIEN, A.; MAJCHRZAK, M.; MATHIS, C.; CASSEL, J. C.; LECOURTIER, L.; The Lateral Habenula as a Relay of Cortical Information to Process Working Memory. **Cerebral Cortex**, v. 27, n. 12, p. 5485-5495, 2017.

MAXIMO, J. O.; CADENA, E. J.; KANA, R. K.; The implications of brain connectivity in the neuropsychology of autism. **Neuropsychology Review**, v. 24, n. 1, p. 16-31, 2014.

MCLELLAN, A. C.; THORNALLEY, P. J.; BENN, J.; SONKSEN, P. H.; Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 87, n. 1, p. 21-29, 1994.

MCGAUGH, J. L.; A multi-trace view of memory storage processes. **Accademia Nazionale dei Lincei**, v. 109, p. 13-28, 1968.

MCGAUGH, J. L.; Memory—a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.

MCMURRAY, K. M.; DISTLER, M. G.; SIDHU, P. S.; COOK, J. M.; ARNOLD, L. A.; PALMER, A. A.; PLANT, L. D.; Glo1 inhibitors for neuropsychiatric and anti-epileptic drug development. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 2, p. 461-467, 2014.

MCMURRAY, K. M.; DU, X.; BROWNLEE, M.; PALMER, A. A.; Neuronal overexpression of Glo1 or amygdalar microinjection of methylglyoxal is sufficient to regulate anxiety-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 119-123, 2016.

MCMURRAY, K. M.; RAMAKER, M. J.; BARKLEY-LEVENSON, A. M.; SIDHU, P. S.; ELKIN, P. K.; REDDY, M. K.; GUTHRIE, M. L.; COOK, J. M.; RAWAL, V. H.; ARNOLD, L. A.; DULAWA, S. C.; PALMER, A. A.; Identification of a novel, fast-acting GABAergic antidepressant. **Molecular Psychiatry**, Epub: Mar 21. Doi: 10.1038/mp.2017.14, 2017.

MEDIRATTA, P. K.; BHATIA, J.; TEWARY, S.; KATYAL, V.; MAHAJAN, P.; SHARMA, K. K.; Attenuation of the effect of progesterone and 4'-chlordiazepam on stress-induced immune responses by bicuculline. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 288-296, 2003.

MILES, W. R.; ROOT, H. F.; Psychologic tests applied in diabetic patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 30, n. 6, p. 767-777, 1922.

MINK, J. W.; BLUMENSCHINE, R. J.; ADAMS, D. B.; Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. **American Journal of Physiology**, v. 241, n. 3, p. 203-212, 1981.

MISRA, K.; BANERJEE, A. B.; RAY, S.; RAY, M.; Glyoxalase III from Escherichia coli: a single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. **Biochemical Journal**, v. 305, Pt. 3, p. 0999-1003, 1995.

MOLERO, P.; RAMOS-QUIROGA, J. A.; MARTIN-SANTOS, R.; CALVO-SÁNCHEZ, E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, L.; MEANA, J. J.; Antidepressant Efficacy and Tolerability of Ketamine and Esketamine: A Critical Review. **CNS Drugs**, v. 32, n. 5, p. 411-420, 2018.

MOLINA, D. K.; DIMAIO, V. J.; Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 33, n. 4, p. 368-372, 2012.

MOORE, M. C.; COATE, K. C.; WINNICK, J. J.; AN, Z.; CHERRINGTON, A. D.; Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo; **Advances in Nutrition**; v. 3, n. 3, p. 286-294, 2012.

MOREIRA, E. L.; DE OLIVEIRA, J.; NUNES, J. C.; SANTOS, D. B.; NUNES, F. C.; VIEIRA, D. S.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; PAMPLONA, F. A.; DE BEM, A. F.; FARINA, M.; WALZ, R.; PREDIGER, R. D.; Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 32, n. 2, p. 495-511, 2012.

MORGENSTERN, J.; FLEMING, T.; SCHUMACHER, D.; ECKSTEIN, V.; FREICHEL, M.; HERZIG, S.; NAWROTH, P.; Loss of glyoxalase 1 induces compensatory mechanism to achieve dicarbonyl detoxification in mammalian schwann cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 8, p. 3224-3238, 2017.

MORRIS, M. C.; The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. **European Journal of Neurology**, v. 1, p. 1-7, 2009.

MOUSAVI MAJD, A.; EBRAHIM TABAR, F.; AFGHANI, A.; ASHRAFPOUR, S.; DEGHAN, S.; GOL, M.; ASHRAFPOUR, M.; POURABDOLHOSSEIN, F.; Inhibition of GABA A receptor improved spatial memory impairment in the local model of demyelination in rat hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 336, p. 111-121, 2018.

MURONETZ, V. I.; MELNIKOVA, A. K.; SEFERBEKOVA, Z. N.; BARINOVA, K. V.; SCHMALHAUSEN, E. V.; Glycation, glycolysis, and neurodegenerative diseases: is there any connection?. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 8, p. 874-886, 2017.

NASEHI, M.; MORTEZA-ZADEH, P.; KHAKPAI, F.; ZARRINDAST, M. R.; Additive effect of harmaline and muscimol for memory consolidation impairment in inhibitory avoidance task. **Neuroscience**, v. 339, p. 287-295, 2016.

NCD-RISC (NCD Risk Factor Collaboration). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **The Lancet**, v. 9; 387, n. 10027, p. 1513-1530, 2016.

NEEPER, M.; SCHMIDT, A. M.; BRETT, J.; YAN, S. D.; WANG, F.; PAN, Y. C.; ELLISTON, K.; STERN, D.; SHAW, A.; Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 21, p. 14998-5004, 1992.

NEMET, I.; VARGA-DEFTERDAROVIĆ, L.; TURK, Z.; Methylglyoxal in food and living organisms. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 12, p. 1105-1117, 2006.

OGAWA, N.; HIROSE, Y.; OHARA, S.; ONO, T.; WATANABE, Y.; A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 50, p. 435-441, 1985.

OTERO, T. M.; Brief review of fluid reasoning: conceptualization, neurobasis, and applications. **Applied Neuropsychology**. Child, v. 6, n. 3, p. 204-211, 2017.

PACKARD, M. G.; CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L.; Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 8477-8481, 1994.

PALANISSAMI, G.; PAUL, S. F. D.; RAGE and Its Ligands: Molecular Interplay Between Glycation, Inflammation, and Hallmarks of Cancer-a Review. **Hormones & Cancer**, v. 9, n. 5, p. 295-325, 2018.

PAUL, C. A.; BELTZ, B.; BERGER-SWEENEY, J.; Observational methods used to assess rat behavior: general activity. **Cold Spring Harbor Protocols**, pdb.prot4799, 2007.

PETERSEN, R. C.; CARACCILO, B.; BRAYNE, C.; GAUTHIER, S.; JELIC, V.; FRATIGLIONI, L.; Mild cognitive impairment: a concept in evolution. **Journal of Internal Medicine**, v. 275, n. 3, p. 214-228, 2014.

PFAFF, D. H.; FLEMING, T.; NAWROTH, P.; TELEMAN, A. A.; Evidence Against a Role for the Parkinsonism-associated Protein DJ-1 in Methylglyoxal Detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 2, p. 685-690, 2017a.

PFAFF, D. H.; FLEMING, T.; NAWROTH, P.; TELEMAN, A. A.; Reply to Richarme: Evidence against a role of DJ-1 in methylglyoxal detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 31, p. 12784-12785, 2017b.

PHILLIPS, S. A.; THORNALLEY, P. J.; Formation of methylglyoxal and D-lactate in human red blood cells in vitro. **Biochemical Society Transactions**, v. 21, n. 2, p. 163S, 1993.

PIEROH, P.; KOCH, M.; WAGNER, D.-C.; BOLTZE, J.; EHRLICH, A.; GHADBAN, C.; HOBUSCH, C.; BIRKENMEIER, G.; DEHGHANI, F.; Temporal Dynamics of Glyoxalase 1 in Secondary Neuronal Injury. **PLoS One**, v. 9, n. 2, e87364, 2014.

PIEROH, P.; WAGNER, D.-C.; ALESSANDRI, B.; NAZARI, M.D.; EHRLICH, A.; GHADBAN, C.; HOBUSCH, C.; BIRKENMEIER, G.; DEHGHANI, F.; Comparative Examination of Temporal Glyoxalase 1 Variations Following Perforant Pathway Transection, Excitotoxicity, and Controlled Cortical Impact Injury. **Neurotoxicity Research**, v. 33, n. 2, p. 412–421, 2018.

POMPLIANO, D. L.; PEYMAN, A.; KNOWLES, J. R.; Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. **Biochemistry**, v. 29, n.13, p. 3186-3194, 1990.

PRATT-HYATT, M.; LICKTEIG, A. J.; KLAASSEN, C. D.; Tissue distribution, ontogeny, and chemical induction of aldo-keto reductases in mice. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 41, n. 8, p. 1480-1487, 2013.

PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H.; Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. R764–R773, 2013.

PRICE, R.B.; DUMAN, R.; Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. **Molecular Psychiatry**, s41380-019-0615-x, 2019.

Protocolos Abcam®. Endereço: <https://www.abcam.com/protocols>. Consulta em dezembro de 2018.

PUIG, M. V.; ROSE, J.; SCHMIDT, R.; FREUND, N.; Dopamine modulation of learning and memory in the prefrontal cortex: insights from studies in primates, rodents, and birds. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. 93, 2014.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J.; Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. **Nature Protocols**, v. 9, n. 8, p. 1969-1979, 2014.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J.; Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 2, p. 221-226, 2015.

RABBANI, N.; XUE, M.; THORNALLEY, P. J.; Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. **Glycoconjugate Journal**, v. 33, n. 4, p. 513-525, 2016.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J.; Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 30, n. 3, p. 354-374, 2019.

RACKER, E.; The mechanism of action of glyoxalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 190, n. 2, p. 685-696, 1951.

RAMIREZ, S.; LIU, X.; LIN, P. A.; SUH, J.; PIGNATELLI, M.; REDONDO, R. L.; RYAN, T. J.; TONEGAWA, S.; Creating a false memory in the hippocampus. **Science**, v. 341, n. 6144, p. 387-391, 2013.

RATLIFF, D. M.; VANDER JAGT, D. J.; EATON, R. P.; VANDER JAGT, D. L.; Increased levels of methylglyoxal-metabolizing enzymes in mononuclear and polymorphonuclear cells from insulin-dependent diabetic patients with diabetic complications: aldose reductase, glyoxalase I, and glyoxalase II--a clinical research center study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 2, p. 488-492, 1996.

RAY, S.; RAY, M.; Isolation of methylglyoxal synthase from goat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 12, p. 6230-6233, 1981.

RICHARME G.; Response to manuscript by Pfaff et al.: Evidence against a role of DJ-1 in methylglyoxal detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 31, p. 12783, 2017.

ROESLER, R.; WALZ, R.; QUEVEDO, J.; DE-PARIS, F.; ZANATA, S. M.; GRANER, E.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R.; BRENTANI, R. R.; Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 71, p. 349-353, 1999.

ROVERONI, R. C.; PARADA, C. A.; CECÍLIA, M.; VEIGA, F. A.; TAMBELI, C. H.; Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Journal of the International Association for the Study of Pain**, v. 94, n. 2, p. 185-191, 2001.

RYAN, L.; LIN, C. Y.; KETCHAM, K.; NADEL, L.; The role of medial temporal lobe in retrieving spatial and nonspatial relations from episodic and semantic memory. **Hippocampus**, v. 20, n. 1, p. 11-18, 2010.

SANAJOU, D.; GHORBANI HAGHJO A.; ARGANI, H.; ROSHANGAR, L.; RASHTCHIZADEH N.; AHMAD, S. N. S.; ASHRAFI-JIGHEH, Z.; BAHRAMBEIGI, S.; ASIAEE, F.; RASHEDI, J.; ASLANI, S.; Reduction of renal tubular injury with a RAGE inhibitor FPS-ZM1, valsartan and their combination in streptozotocin-induced diabetes in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 842, p. 40-48, 2019.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R.; Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SCHLEICHER, E.; FRIESS, U.; Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. **Kidney International Supplements**, v. 106, p. S17-S26, 2007.

SCHMIDT, A. M.; HORI, O.; CHEN, J. X.; LI, J. F.; CRANDALL, J.; ZHANG, J.; CAO, R.; YAN, S. D.; BRETT, J.; STERN, D.; Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 3, p. 1395-1403, 1995.

SERRANO, F.; KLANN, E.; Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. **Ageing Research Reviews**, v. 3, n. 4, p. 431-443, 2004.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z.; Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 1, p. 04-14, 2010.

SHIBAMOTO, T.; Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 12-25, 2006.

SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L.; Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129-46, 2001.

SOETENS, E.; CASAER, S.; D'HOOGHE, R.; HUETING, J. E.; Effect of amphetamine on long-term retention of verbal material. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 119, n. 2, p. 155-162, 1995.

SONG, D. W.; XIN, N.; XIE, B. J.; LI, Y. J.; MENG, L. Y.; LI, H. M.; SCHLÄPPI, M.; DENG, Y. L.; Formation of a salsolinol-like compound, the neurotoxin, 1-acetyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, in a cellular model of hyperglycemia and a rat model of diabetes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 3, p. 736-742, 2014.

SORCI, G.; RIUZZI, F.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R.; RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 1, p. 101-109, 2013.

SOUSA SILVA, M.; GOMES, R. A.; FERREIRA, A. E.; PONCES FREIRE, A.; CORDEIRO, C.; The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. **Biochemical Journal**, v. 453, n. 1, p. 01-15, 2013.

SRIKANTH, V.; WESTCOTT, B.; FORBES, J.; PHAN, T. G.; BEARE, R.; VENN, A.; PEARSON, S.; GREENAWAY, T.; PARAMESWARAN, V.; MÜNCH, G.; Methylglyoxal, cognitive function and cerebral atrophy in older people. **The journals of gerontology**, v. 68, n. 1, p. 68-73, 2013.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P.; The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 85, p. 367-370, 1985.

SZCZEPANIK, J. C.; DE ALMEIDA, G. R. L.; CUNHA, M. P.; DAFRE, A. L.; Repeated Methylglyoxal Treatment Depletes Dopamine in the Prefrontal Cortex, and Causes Memory Impairment and Depressive-Like Behavior in Mice. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 2, p. 354-370, 2020.

TAGHAVI, F.; HABIBI-REZAEI, M.; AMANI, M.; SABOURY, A. A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; The status of glycation in protein aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 100, p. 67-74, 2017.

TAGUCHI, A.; BLOOD, D. C.; DEL TORO, G.; CANET, A.; LEE, D. C.; QU, W.; TANJI, N.; LU, Y.; LALLA, E.; FU, C.; HOFMANN, M. A.; KISLINGER, T.; INGRAM, M.; LU, A.; TANAKA, H.; HORI, O.; OGAWA, S.; STERN, D. M.; SCHMIDT, A. M.; Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 354-360, 2000.

TAN, X.; GU, J.; ZHAO, B.; WANG, S.; YUAN, J.; WANG, C.; CHEN, J.; LIU, J.; FENG, L.; JIA, X.; Ginseng improves cognitive deficit via the RAGE/NF- κ B pathway in advanced glycation end product-induced rats. **Journal of Ginseng Research**, v. 39, n. 2, p. 116-124, 2015.

THOMPSON, J. L.; ROSELL, D. R.; SLIFSTEIN, M.; GIRGIS, R. R.; XU, X.; EHRLICH, Y.; KEGELES, L. S.; HAZLETT, E. A.; ABI-DARGHAM, A.; SIEVER, L. J.; Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizotypal personality disorder: a PET study with [11 C]NNC112. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, n. 21, p. 4231-4240, 2014.

THORNALLEY, P. J.; Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. **Biochemical Journal**, v. 254, n. 3, p. 751-755, 1988.

THORNALLEY, P. J.; The glyoxalase system in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 14, p. 287-371, 1993.

THORNALLEY, P. J.; Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification - a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 565-573, 1996.

THORNALLEY, P. J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H. S.; Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochemical Journal**, v. 344, n. 1, p. 109-116, 1999.

THORNALLEY, P. J.; Glyoxalase I: structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, Pt. 6, p. 1343-1348, 2003.

THORNALLEY, P. J.; BATTAH, S.; AHMED, N.; KARACHALIAS, N.; AGALOU, S.; BABAEI-JADIDI, R.; DAWNAY, A.; Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. **The Biochemical Journal**, v. 375 (Pt. 3), p. 581-592, 2003.

THORNALLEY, P. J.; Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 111-117, 2005.

THORNALLEY, P. J.; Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 23, n. 1-2, p. 125-150, 2008.

THORNALLEY, P. J.; WARIS, S.; FLEMING, T.; SANTARIUS, T.; LARKIN, S. J.; WINKLHOFER-ROOB, B. M.; STRATTON, M. R.; RABBANI, N.; Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 16, p. 5432-5442, 2010.

THORNALLEY, P. J.; RABBANI, N.; Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 3, p. 318-325, 2011.

TIAN, C.; ALOMAR, F.; MOORE, C. J.; SHAO, C. H.; KUTTY, S.; SINGH, J.; BIDASEE, K. R.; Reactive carbonyl species and their roles in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling defect in the diabetic heart. **Heart Failure Reviews**, v. 19, n. 1, p. 101-112, 2014.

TOLMAN, E. C.; Purpose and cognition: the determiners of animal learning. **Psychological Review**, v. 32, p. 285-297, 1925.

VAN SCHOUWENBURG, M.; AARTS, E.; COOLS, R.; Dopaminergic modulation of cognitive control: distinct roles for the prefrontal cortex and the basal ganglia. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 18, p. 2026-2032, 2010.

VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; WALZ, R.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 72, n. 3, p. 353-364, 2000.

VOGEL-CIERNIA, A.; WOOD, M. A.; Examining object location and object recognition memory in mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 69, n. 8.31, p. 01-17, 2014.

XIE, B.; LIN, F.; PENG, L.; ULLAH, K.; WU, H.; QING, H.; DENG, Y.; Methylglyoxal increases dopamine level and leads to oxidative stress in SH-SY5Y cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)**, v. 46, n. 11, p. 950-956, 2014.

XUE J.; RAY, R.; SINGER, D.; BÖHME, D.; BURZ, D. S.; RAI, V.; HOFFMANN, R.; SHEKHTMAN, A.; The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. **Biochemistry**, v. 53, n. 20, p. 3327-3335, 2014.

WALTER, A. W.; HENLE, T.; HAESSNER, R.; KLOSTERMEYER, H.; Studies on the formation of lysinomethylalanine and histidinomethylalanine in milk products. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 199, n. 3, p. 243-247, 1994.

WATANABE, K.; OKADA, K.; FUKABORI, R.; HAYASHI, Y.; ASAHI, K.; TERAWAKI, H.; KOBAYASHI, K.; WATANABE, T.; NAKAYAMA, M.; Methylglyoxal (MG) and cerebro-renal interaction: does long-term orally administered MG cause cognitive impairment in normal Sprague-Dawley rats?. **Toxins (Basel)**, v. 6, n. 1, p. 254-69, 2014.

WAUTIER, M. P.; CHAPPEY, O.; CORDA, S.; STERN, D. M.; SCHMIDT, A. M.; WAUTIER, J. L.; Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 5, E685-694, 2001.

WEST, R. K.; MOSHIER, E.; LUBITZ, I.; SCHMEIDLER, J.; GODBOLD, J.; CAI, W.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H.; SILVERMAN, J. M.; BEERI, M. S.; Dietary advanced glycation end products are associated with decline in memory in young elderly. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 140, p. 10-12, 2014.

WONG, M. L.; LICINIO, J.; Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, n. 5, p. 343-351, 2001.

WOODBERRY, E.; BROWNE, G.; HODGES, S.; WATSON, P.; KAPUR, N.; WOODBERRY, K.; The use of a wearable camera improves autobiographical memory in patients with Alzheimer's disease. **Memory**, v. 23, n. 3, p. 340-349, 2015.

YAN, S. D.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P.; STERN, D. M.; RAGE and Alzheimer's disease: a progression factor for amyloid-beta-induced cellular perturbation?. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, n. 4, p. 833-843, 2009.

YANG, C.; LI, X.; MO, Y.; LIU, S.; ZHAO, L.; MA, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; CHEN, Y.; YU, X.; FANG, S.; ZHANG, Y.; XIAN, S.; WANG, Q.; β -Asarone Mitigates Amyloidosis and Downregulates RAGE in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 1, p. 121-130, 2016.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I.; Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 2, p. 181-213, 2011.

YOON, I. S.; KIM, H. S.; HONG, J. T.; LEE, M. K.; OH, K. W.; Inhibition of muscimol on morphine-induced hyperactivity, reverse tolerance and postsynaptic dopamine receptor supersensitivity. **Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 204-209, 2002.

ZACCARDI, F.; WEBB, D. R.; YATES, T.; DAVIES, M. J.; Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgraduate Medical Journal**, v. 92, n. 1084, p. 63-69, 2016.

ZAKARIA, M. N.; EL-BASSOSSY, H. M.; BARAKAT, W.; Targeting AGEs Signaling Ameliorates Central Nervous System Diabetic Complications in Rats. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2015, n. 346259, 2015.

ZARRINDAST, M. R.; BAKHSHA, A.; ROSTAMI, P.; SHAFAGHI, B.; Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 16, n. 4, p. 313-319, 2002.