

SUMMARY

Strict coupling of energy metabolism and neurotransmission with cellular function and cerebral regionalization is mandatory for an adequate operation of the Central Nervous System. Despite decades of work, the classical neurochemical approaches proved limited in unravelling the coupling mechanisms involved in these complex interactions. The combination of several frontier methodologies, including imaging and spectroscopy by Magnetic Resonance methods, is currently contemplated as a more powerful alternative.

Intra- and intercellular pyruvate and lactate metabolisms play an important role in the metabolic coupling of neurons and glial cells. However, the directionality of intra- and intercellular monocarboxylate exchange, the role of neuronal and glial redox states and monocarboxylate compartmentation and the relationship of these variables with neurotransmission, remain crucial and insufficiently understood aspects. In this thesis, I address the cerebral metabolism of pyruvate and lactate, its intra- and extracellular compartmentation, its relationship to the neuronal and glial tricarboxylic acid cycles of neurons and glial cells, and how all these processes are integrated *in vivo* and *in vitro* into a functionally operating unit during glutamatergic neurotransmission. To this end I combined the classical neurochemical approach, including conventional biochemical assays, with more recent developments such as ^{13}C and ($^{13}\text{C},^2\text{H}$) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques. I emphasize how these novel approaches have modified the earlier interpretations of neuroglial coupling during glutamatergic neurotransmission.

In **chapter 1**, I begin with a general description of brain energy metabolism, including the main pathways of cerebral energetics and the experimental approaches used for these studies. I review the vital roles of pyruvate and lactate in the neuronal and glial cells, providing an updated revision of the cerebral energetics, integrating previous proposals. I address in more detail NMR Spectroscopy methods, in order to allow later a better understanding and discussion of the results presented. On these grounds, I show that modern NMR methods acquire vital importance for the understanding of the neuroglial coupling during glutamatergic, GABAergic or even serotonergic neurotransmissions.

Chapters 2 and 3 present new methodologies to investigate lactate recycling between extracellular space and the cytosolic pool of pyruvate through the monocarboxylate transporters of the plasma membrane and the lactate dehydrogenase isozymes of C6 glioma cells. In chapter 2, two novel ^1H NMR approaches are presented to characterize the recycling process, one of them based in a specific lactate editing sequence. In chapter 3, a novel ($^{13}\text{C},^2\text{H}$) NMR approach was also formulated to address alternatively this question. In these experiments, C6 glioma cells were incubated in Krebs-Henseleit buffer containing 50% $^2\text{H}_2\text{O}$ and ($3\text{-}^{13}\text{C}$) lactate. Samples of

incubation medium were collected at different time points and analyzed by ^{13}C NMR to determine the kinetics of deuteration of (3- ^{13}C) lactate. The use of ^{13}C NMR spectroscopy to detect deuteration in the ^{13}C labeled precursor proved to be a powerful technique to study hydrogen turnover, providing complementary information to the traditional ^{13}C NMR methods routinely used to investigate carbon turnover. Additionally, several experiments were done with different mixtures of labeled substrates, demonstrating that the deuteration process that allows the study of this lactate recycling is redox sensitive and that glycolysis is a redox controlled process.

Chapter 4 presents our novel hypothesis describing the metabolic coupling between neuronal and glial cells in the brain during neurotransmission. The results obtained in the previous chapters provide the basis to this new theory, including the presence of subcellular compartmentation of pyruvate and monocarboxylate recycling through the plasma membrane of both neurons and glial cells. We describe the mechanisms underlying this Redox Switch/Redox Coupling hypothesis, as well as its kinetic properties, in primary cultures of cortical neurons and astrocytes from rat brain. With these results we delineated a revised interpretation of the mechanisms underlying metabolic coupling, compatible also with the subcellular compartmentation of monocarboxylates and glutamate, as well as with the redox switch and monocarboxylate recycling through the plasma membrane. The proposed redox shuttles may couple the activity of glycolytic and oxidative environments, providing a general mechanism of intra- and intercellular coupling supporting universally metabolic heterogeneity in cells.

Gene targeting technology has become recently a valuable tool for the understanding of some specific neurodegenerative diseases and Magnetic Resonance Spectroscopy is a very appropriate technique to characterize these transgenic mice models. **Chapter 5** combines ^{13}C NMR spectroscopy and gene targeting techniques to investigate glutamatergic neurotransmission and glutamate-glutamine cycle in brain extracts of D_1 or D_2 dopamine receptors deficient mice. We complemented our experimental design using a pharmacological approach based on reserpine, a dopamine depleting drug, and also on L-DOPA, the basis of the clinical antiparkinsonian treatment. Additional behavioural and c-Fos expression tests were used to investigate in more detail the dopamine receptor subtype that mediates the communication between both neurotransmission systems. Together, our results indicate that the lack of dopamine or D_1 dopamine receptors, but not D_2 receptors, results in increased glutamatergic activity. Our data reveal that the D_1 dopamine receptor subtype is the main mediator of the metabolic interactions between glutamatergic and dopaminergic neurotransmissions.

RESUMO

O adequado funcionamento do Sistema Nervoso Central requer uma integração precisa do metabolismo energético e da neurotransmissão entre os diversos tipos celulares envolvidos, assim como a sua distribuição precisa entre as diferentes regiões cerebrais. Apesar de décadas de trabalho, os métodos da neuroquímica clássica provaram ser muito limitadas na clarificação dos mecanismos de acoplamento envolvidos nestas complexas interações. A combinação de várias metodologias, incluindo métodos de imagem e de espectroscopia por Ressonância Magnética, contempla-se mais recentemente como uma alternativa mais robusta.

O metabolismo do piruvato e do lactato intra- e extracelular tem um papel importante no acoplamento metabólico de neurónios e células gliais. No entanto, a direccionalidade dos intercâmbios intra- e intercelular de monocarboxilatos, o papel dos estados redox neuronais e gliais e a compartimentação intracelular dos monocarboxilatos, assim como a relação destas variáveis com a neurotransmissão continuam ainda a ser aspectos insuficientemente compreendidos. Nesta tese, pretende-se avaliar o metabolismo do piruvato e do lactato, a sua compartimentação intra- e extracelular, a sua relação aos ciclos dos ácidos tricarboxílicos neuronais e gliais, bem como a interligação desta rede de processos numa unidade funcional durante a neurotransmissão glutamatérgica, tanto *in vivo* como *in vitro*. Com vista a alcançar este objectivo, combinam-se abordagens da neuroquímica clássica, como os ensaios enzimáticos convencionais, com os mais recentes avanços tecnológicos, como sejam as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e de ($^{13}\text{C}, ^2\text{H}$). Neste trabalho destaca-se como estas novas abordagens modificam as interpretações tradicionais do acoplamento neuroglial durante a neurotransmissão glutamatérgica.

No **capítulo 1**, inicia-se com uma descrição geral do metabolismo energético cerebral, descrevendo as principais vias metabólicas da energética cerebral e as abordagens experimentais utilizadas nestes estudos. Em concreto, resumem-se os papéis fundamentais do piruvato e do lactato nas células neuronais e gliais, apresentando-se uma actualizada revisão do funcionamento da energética cerebral, integrando as propostas apresentadas anteriormente. Foi dado especial ênfase na explicação da Espectroscopia por RMN, com o objectivo de possibilitar ao leitor uma adequada compreensão e discussão dos resultados apresentados. Neste contexto, os métodos modernos de RMN adquirem uma importância fulcral para a compreensão do acoplamento neuroglial durante as neurotransmissões glutamatérgica, GABAérgica, e mesmo serotoninérgica.

Os **capítulos 2 e 3** apresentam novas metodologias para estudar a reciclagem de monocarboxilatos entre o espaço extracelular e o citosólico, através dos transportadores de monocarboxilatos da membrana plasmática e da lactato desidrogenase de células de glioma C6. O capítulo 2 descreve duas novas abordagens de RMN de ^1H para caracterizar este processo de reciclagem, sendo uma

delas baseada numa sequência específica de edição de RMN de ^1H para lactato. Por outro lado, no capítulo 3 desenvolveu-se também uma nova técnica de RMN de ($^{13}\text{C}, ^2\text{H}$), com o intuito de resolver, de forma alternativa, esta questão. Para este fim, incubaram-se células de glioma C6 em tampão Krebs-Henseleit, contendo 50% $^2\text{H}_2\text{O}$ e ($3\text{-}^{13}\text{C}$) lactato. Recolheram-se, a diferentes tempos de incubação, amostras do meio, analisando-se por RMN de ^{13}C , com o objectivo de determinar a cinética de deuteração de ($3\text{-}^{13}\text{C}$) lactato. A utilização da Espectroscopia de RMN de ^{13}C para detectar deuteração nos precursores marcados com ^{13}C demonstrou ser uma técnica muito robusta para o estudo dos intercâmbios de hidrogénio, fornecendo informação complementar à RMN de ^{13}C tradicional, utilizada de forma rotineira para elucidar os intercâmbios de carbono. Adicionalmente, várias experiências foram realizadas com diferentes combinações de compostos marcados, demonstrando-se que o processo de deuteração que permite o estudo da reciclagem de lactato é sensível às condições redox, e que a glicólise é também um processo modulado pelo estado redox.

O capítulo 4 inclui a nossa nova hipótese de acoplamento metabólico entre as células neuronais e gliais no cérebro. Os resultados obtidos nos capítulos prévios proporcionam a base para esta nova interpretação, que inclui a presença da compartimentação sub-celular do piruvato e da reciclagem de monocarboxilatos através da membrana plasmática, tanto de neurónios como de células gliais. Descrevem-se também os mecanismos que estão na base da hipótese Interruptor Redox/Acoplamento Redox, assim como as suas propriedades cinéticas, em culturas primárias de neurónios corticais e de astrócitos de cérebro de rato. Com estes resultados, pudemos construir uma interpretação revista do acoplamento metabólico, sendo compatível com a compartimentação sub-celular de piruvato, lactato e glutamato, com o interruptor redox e com a reciclagem de monocarboxilatos através da membrana plasmática. Por fim, os *shuttles* redox propostos podem acoplar a actividade dos ambientes oxidativos e glicolíticos, fornecendo um mecanismo geral para o acoplamento intra- e intercelular que sustentam a heterogeneidade metabólica nas células.

A tecnologia associada à manipulação de genes tem-se tornado recentemente uma valiosa ferramenta para a compreensão de algumas doenças neurodegenerativas específicas, sendo a Espectroscopia por RMN uma das técnicas mais apropriadas para a caracterização fenotípica destes modelos de ratos transgénicos. O capítulo 5 combina a Espectroscopia por RMN de ^{13}C e as técnicas associadas à manipulação de genes para investigar a neurotransmissão glutamatérgica e o ciclo glutamina-glutamato, em extractos cerebrais de ratos deficientes nos receptores dopamina D_1 ou D_2 . Complementamos o nosso protocolo experimental usando uma abordagem farmacológica baseada na administração de reserpina, um fármaco que reduz a quantidade disponível de dopamina, e de L-DOPA, que constitui a base de tratamentos clínicos anti-parkinsonianos. Ampliamos a nossa abordagem com testes de comportamento e de expressão de c-Fos adicionais para caracterizar com

maior profundidade o sub-tipo de receptores de dopamina que medeia a comunicação entre ambos sistemas de neurotransmissão. Os nossos resultados indicam que a falta de dopamina ou a ausência de receptores D_1 (mas não de receptores D_2) produz um aumento na actividade glutamatérgica. Estes resultados associam claramente o receptor D_1 da dopamina na regulação das interacções metabólicas entre as neurotransmissões glutamatérgica e dopaminérgica.