



LUCIENE LENHARE

CARACTERIZAÇÃO DA S-NITROSAÇÃO DA SIRT1 NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ENVELHECIMENTO

*CHARACTERIZATION OF S-NITROSATION OF SIRT1 IN SKELETAL
MUSCLE IN EXPERIMENTAL MODEL OF AGING.*

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LUCIENE LENHARE

CARACTERIZAÇÃO DA S-NITROSAÇÃO DA SIRT1 NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENVELHECIMENTO

*CHARACTERIZATION OF S-NITROSATION OF SIRT1 IN SKELETAL MUSCLE
IN EXPERIMENTAL MODEL OF AGING.*

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

CO-ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. José Rodrigo Pauli

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

Master's Thesis presented to the Pos graduation in Medical Clinic of the Faculty of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP to obtain the title of Master in Sciences concentration Medical Clinic.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA POR LUCIENE LENHARE
E ORIENTADA PELO PROF. DR.
EDUARDO ROCHETE ROPELLE

EDUARDO ROCHETE ROPELLE

Assinatura do Orientador

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L547c Lenhare, Luciene, 1984-
Caracterização da S-nitrosação da SIRT1 no músculo
esquelético em modelo experimental de envelhecimento /
Luciene Lenhare. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Eduardo Rochete Ropelle.
Coorientador : José Rodrigo Pauli.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Envelhecimento. 2. Músculos. 3. Insulina. 4. S-
nitrosação. 5. SIRT1. I. Ropelle, Eduardo Rochete, 1976-.
II. Pauli, José Rodrigo, 1979-. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of S-nitrosation of SIRT1 in skeletal muscle in
experimental model of aging

Palavras-chave em inglês:

Aging

Muscles

Insulin

S-nitrosação

SIRT1

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

José Rodrigo Pauli [Coorientador]

Marco Antonio de Carvalho Filho

Adelino Sánchez Ramos da Silva

Data de defesa: 22-09-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

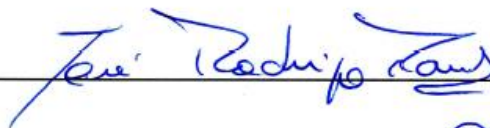
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LUCIENE LENHARE

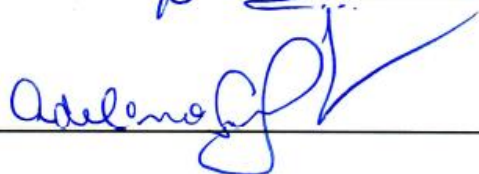
ORIENTADOR(A): PROF. DR. EDUARDO ROCHERE ROPELLE

MEMBROS:

1. PROF. DR. JOSÉ RODRIGO PAULI



2. PROF. DR. ADELINO SANCHÉZ RAMOS DA SILVA



3. PROF. DR. MARCO ANTONIO DE CARVALHO FILHO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22 de setembro de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico com carinho este trabalho aos meus pais, José e Fátima, aos meus irmãos, Aline e Mateus, e ao meu noivo Fábio.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado por doações da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2012 / 14746-1).

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e por me iluminar em todos os meus passos.

A minha família por estarem sempre ao meu lado, motivando e me apoiando incondicionalmente. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle o meu apreço e admiração, por acreditar em minha capacidade, pela orientação, e principalmente por estender os braços nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. José Rodrigo Pauli por estar sempre ao meu lado me ensinando, e enriquecendo meu conhecimento com sua experiência e sabedoria.

Ao Professor Mário Saad agradeço e Professor José Barreto Cavalleira por abrir as portas de seu laboratório, por toda a estrutura oferecida para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Professores Dennys Cintra pela oportunidade que me deu de ver a ciência através de um outro olhar.

Agradeço a Sandra, Dioze, Andrey pelo exemplo de profissionalismo e por sempre me ajudar no que fora preciso. Aos técnicos Senhores Luís e Jósimo pela cooperação, preparação dos reagentes e por deixar nossas caixas de blotts e tubos de extração impecáveis.

Agradeço aos amigos do LICRI e LABMEX Fernanda Pace, Francine Mittestainer, Kelly Calisto, Natália Tobar, Agélica Camacho Pereira, Guilherme Zweig, Carla Bueno, Gustavo Pimetel, Rafael Calais Gaspar e Rodolfo Marinho pela amizade e subsídios para que eu pudesse crescer.

Aos amigos de grupo, Maria Carolina Mendes, Juliana Alves, Thayana Micheletti, Vagner Ramom Rodrigues Silva e, Carlos Kiyoshi Katashima fica aqui documentado o meu carinho, minha eterna gratidão e memoráveis dias que passamos no Laboratório para que eu conseguisse concluir meus experimentos.

As técnicas do CEMIB Érica e Regina, e do núcleo de medicina experimental Senhor Zé, Antônio, Marino, Edna agradeço pelas solicitações que prontamente foram atendidas.

E todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente, por terem compreendido minhas ausências, por me mostrarem que eu era capaz de superar todas as dificuldades.

EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu tamanho
original.” **Albert Einstein***

RESUMO

SIRT1 são proteínas NAD⁺ dependentes que formam uma classe de proteínas com atividade desacetilase, que exercem um papel crítico na biogênese mitocondrial, homeostase da glicose e sensibilidade à insulina. No entanto o mecanismo pós-translacional de controle da atividade da SIRT1 permanece obscuro. No presente estudo investigou-se o papel da enzima Óxido Nítrico Sintase (iNOS) na S-nitrosação da SIRT1 no músculo de camundongos idosos. Primeiro identificou-se alto níveis da proteína iNOS no músculo esquelético de animais envelhecidos, tal fato foi acompanhado pelo aumento da S-nitrosação da SIRT1 e aumento da acetilação da PGC1 α e FOXO1 levando ao comprometimento da biogênese mitocondrial. Foi demonstrado que o tratamento com óxido nítrico (NO) induziu a S-nitrosação da SIRT1 e reduziu a sua atividade desacetilase. Curiosamente, os camundongos *knockout* iNOS exibiram baixos níveis de S-nitrosação da SIRT1 e uma maior biogênese mitocondrial durante o envelhecimento, quando comparado com os camundongos do tipo selvagem. Finalmente, foi demonstrado que a S-nitrosação da SIRT1 é um mecanismo reversível, uma vez que a administração do inibidor farmacológico da iNOS (L-NIL) foi capaz de reduzir a S-nitrosação da SIRT1 e aumentar a atividade da SIRT1 incluindo a atividade dos seus substratos PGC1 α , FOXO1 e AMPK no músculo de camundongos idosos. Coletivamente, o nosso estudo fornece evidências substanciais que a iNOS induz a S-nitrosação da SIRT1 e está associada com a diminuição da função mitocondrial no músculo esquelético de camundongos idosos.

ABSTRACT

SIRT1, an NAD⁺ dependent deacetylase, exerts a critical role on mitochondrial biogenesis, glucose homeostasis and insulin sensitivity. However, the post-translational mechanism that SIRT1 controls the activity remains unclear. Here we investigate the role of Nitric Oxide Synthase (iNOS) on SIRT1 S-nitrosation in muscle of old mice. First we identify high levels of iNOS protein levels in the skeletal muscle of aged mice and it was accompanied by the augmentation of SIRT1 S-nitrosation, PGC1 α and FOXO1 acetylation and impairment of mitochondrial biogenesis. We demonstrated that nitric oxide (NO) donor treatment induced SIRT1 S-nitrosation and it reduced deacetylase activity. Interestingly, iNOS *knockout* mice exhibited low levels of SIRT1 S-nitrosation and higher mitochondrial biogenesis during aging, when compared to wild type mice. Finally, we demonstrated that SIRT1 S-nitrosation is a reversible mechanism, once the pharmacological iNOS inhibitor (L-NIL) administration, reduced SIRT1 S-nitrosation and increased the activity of the SIRT1 substrates, including, PGC1 α , FOXO1 and AMPK in muscle of old mice. Collectively, our study provides substantial evidence that SIRT1 induces iNOS S-nitrosation and it is associated with the impairment of mitochondrial function in the skeletal muscle of aged mice.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína serina -treonina-quinase
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
CH ₃ CO ₂	Grupo funcional acetila
DNA-PK	Proteína quinase ativada por DNA
eNOS ou NOS 3	NO Sintase Endotelial
FOXO	Fator de transcrição FOXO1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GSNO	S-nitrosoglutathione
HDAC2	Histona desacetilase-2
HIF	Fatores induzidos por hipóxia
IR	Receptor de insulina
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1
iNOS ou NOS2	Óxido Nítrico Sintase induzível
iNOS KO	Camundongo nocaute para iNOS
LPS	Lipopolissacarídeo
L-NIL	L-N ₆ -(1-iminoethyl) lysine
mtDNA	DNA mitocondrial
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MTCO1	Complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial
NRF-1 e NRF-2	Fatores respiratórios nucleares
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase

NO ⁺	Nitrosónio ion (NO ⁺)
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
nNOS ou NOS 1	NO Sintase Neuronal
NFKB	Fator de transcrição kappa B
PGC1 α	Coativador de fatores de transcrição
PPARalfa/beta	Genes envolvidos no metabolismo oxidativo
SIRT6	Regulador de informação silenciosa
S-H	Grupamento tiol
S-NO	Grupamento nitroso-tiol
Uqcrc1	Complexo III da cadeia respiratória mitocondrial
VCO ₂	Produção de dióxido de carbono
VO ₂	Consumo de oxigênio

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- JUSTIFICATIVA	11
3- HIPÓTESE	12
4- OBJETIVOS.	13
<i>Objetivo geral</i>	13
<i>Objetivos específicos</i>	13
5- ARTIGO EM INGLÊS	15
<i>Abstract</i>	16
<i>Introduction</i>	17
<i>Results</i>	19
<i>Discussion</i>	23
<i>Methods</i>	27
<i>References</i>	35
<i>Figure Legends</i>	43
<i>Figures</i>	45
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7- REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

Envelhecimento, disfunção mitocondrial e resistência à insulina.

Recentes pesquisas publicadas pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e Pnad (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios) demonstram que o número de idosos no Brasil está crescendo. Esses dados estão de acordo com o que vem acontecendo em diversos países europeus como Itália, Espanha e Alemanha. Em 2002 a quantidade de pessoas com mais de 60 anos no Brasil era 7,9% da população, em 2008 dos quase 190 milhões de brasileiros, 21 milhões eram idosos, representando mais de 11% da população (www.ibge.gov.br). A evolução da expectativa de vida ao longo do tempo está associada principalmente com a melhora da qualidade de vida e aos avanços científicos e tecnológicos. O aumento da sobrevida pode ser considerado o principal fator responsável pelo aumento do número de idosos, uma vez que a porcentagem da população jovem vem apresentando queda nos últimos anos (www.ibge.gov.br).

No entanto, o envelhecimento está associado a um declínio de diversas funções fisiológicas humanas. O decréscimo do metabolismo de carboidratos em idosos é uma das marcas distintivas do processo de envelhecimento. Substanciais evidências demonstram que o aumento da idade está associado com a diminuição da tolerância à glicose e aumento da incidência de diabetes do tipo 2¹⁻³. A intolerância a glicose presente no envelhecimento se manifesta principalmente por um aumento na resposta de glicemia pós-prandial, enquanto níveis de glicemia de jejum geralmente são apenas ligeiramente elevados. Intolerância a glicose

observada em idosos é atribuída a uma multiplicidade de causas, como a má alimentação, inatividade física, diminuição da massa magra, aumento da adiposidade visceral, diminuição relativa da secreção de insulina e resistência periférica à insulina ^{4,5}. Durante o envelhecimento, alterações na via de transmissão do sinal da insulina podem ser observadas em diferentes tecidos periféricos insulino-sensíveis, como fígado e músculo ⁶. No entanto, as anormalidades moleculares que ocorrem em pacientes idosos com diabetes ou resistência à insulina não foram completamente elucidadas.

A preservação da quantidade e das funções metabólicas do músculo esquelético pode ser considerada um aspecto positivo sobre a saúde do idoso, uma vez que o músculo representa aproximadamente 40% da massa corporal total e exerce papel primordial sobre o metabolismo da glicose e dos ácidos graxos⁷. O músculo esquelético é um dos principais alvos da ação da insulina, sendo que, aproximadamente 70% da glicose ingerida é oxidada no músculo esquelético para obtenção de energia ou armazenada sob a forma de glicogênio. Adicionalmente, o músculo é o maior tecido envolvido na oxidação dos lipídios para obtenção de energia. Em esforço físico o músculo consome aproximadamente 40% dos ácidos graxos em circulação; em repouso mais de 90% da energia despendida é obtida a partir da oxidação deste substrato. Assim, a plena funcionalidade desse tecido é crucial para o controle do metabolismo energético ⁷⁻⁹. No entanto, o processo de envelhecimento é geralmente acompanhado de substancial redução das funções orgânicas do músculo esquelético ¹⁰.

No envelhecimento, o declínio na função mitocondrial é comumente observado em diferentes tecidos, particularmente em tecidos altamente oxidativos, como o músculo esquelético ¹¹. Segundo a teoria mitocondrial do envelhecimento, os danos cumulativos causados pela produção de radicais livres alteram a estabilidade do DNA mitocondrial (mtDNA) comprometendo a funcionalidade dos sistemas orgânicos ¹². Os radicais livres podem levar a um declínio da abundância do DNA mitocondrial e consequentemente, reduzir o número de genes que codificam proteínas mitocondriais ^{13,14}. Evidências que apontam que essas disfunções nas mitocôndrias observadas no músculo são determinantes para o comprometimento do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos, levando à resistência à insulina ^{15,16}.

Nos últimos anos, alguns coativadores de fatores de transcrição tiveram destaque no controle da biogênese mitocondrial, em particular, o PGC-1 α (*receptor proliferator-activated peroxissoma γ coativador α*), considerado como principal regulador da biogênese mitocondrial e do metabolismo oxidativo em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético ¹⁷. De maneira interessante, níveis reduzidos de PGC-1 α no músculo foram observados durante o processo de envelhecimento¹⁸, bem como em condições de redução de massa muscular ^{19,20}. Curiosamente a superexpressão, de PGC-1 α foi determinante para a conservação da função mitocondrial e integridade do músculo nestas condições, em parte através da estimulação da biogênese mitocondrial e da atenuação das vias de morte celular ^{19,20}. Mecanismos de modulação pós transcricionais são

determinantes para que o PGC-1 α alcance seus efeitos biológicos, dentre esses mecanismos destaca-se a acetilação ^{21,22}.

Acetilação é uma reação química na qual um grupo funcional acetila (CH₃CO) é adicionado a um determinado composto orgânico. No caso específico do PGC-1 α o grupamento acetila se liga a resíduos de lisina constituinte da estrutura da proteína. Na forma acetilada, o PGC-1 α tem a sua atividade reprimida, contrariamente, a desacetilação dos resíduos de lisina do PGC-1 α está relacionada ao aumento da sua função e conseqüentemente da biogênese mitocondrial ^{21,22}. Vale destacar que algumas moléculas, denominadas deacetilases, são responsáveis pela remoção dos grupamentos acetila de diversas proteínas, dentre elas, destaca-se a SIRT1.

SIRT1 e função mitocondrial

As sirtuínas formam uma classe de proteínas com atividade desacetilase. A família das SIRTs (do inglês, *silent mating type information regulator 2 homolog*) é composta 7 moléculas (SIRT1-7). Atualmente, sabe-se que as SIRTs são diferencialmente distribuídas nos compartimentos celulares, a saber; núcleo (SIRT1,2,6 e 7); citoplasma (SIRT1 e 2); mitocôndria (SIRT3,4 e 5) ²³. A SIRT1 foi originalmente descrita como uma molécula com diversas funções biológicas, entre elas; controle da inflamação, silenciamento genético, apoptose, metabolismo celular e reparo de DNA ²⁴.

Evidências mostraram que a SIRT1 medeia diversos efeitos biológicos através da ativação da AMPK, por mecanismo ainda não conhecido e principalmente pela desacetilação de alguns fatores de transcrição, como a PGC1 α ²⁵, FOXO1^{26,27} e p53²⁸ (Figura 1a).

A SIRT1 surgiu como alvo terapêutico promissor no combate a uma série de distúrbios metabólicos incluindo a obesidade e diabetes, uma vez que esta enzima promove efeitos anti-inflamatórios, melhora da sensibilidade à insulina e principalmente aumento da biogênese mitocondrial através da desacetilação e ativação do PGC-1 α ^{25,29}. A desacetilação do PGC-1 α promovida pela SIRT1 é essencial para que ocorra a coativação dos fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e NRF-2), que induzem a transcrição de genes envolvidos na biogênese mitocondrial^{21,30}.

A expressão proteica e a atividade desacetilase da SIRT1 no músculo esquelético de camundongos obesos e idosos mostraram-se significativamente reduzidas, contribuindo para o quadro de resistência à insulina^{31,32}. Na figura 1a. elucidamos esquematicamente que ativadores da SIRT1 como, a restrição calórica, o exercício físico e um polifenol conhecido como Resveratrol são capazes de aumentar a atividade desacetilase da SIRT1 ativando seus substratos FOXO1 e PGC1 α e consequentemente a biossíntese mitocondrial em mamíferos^{31,33,34}.

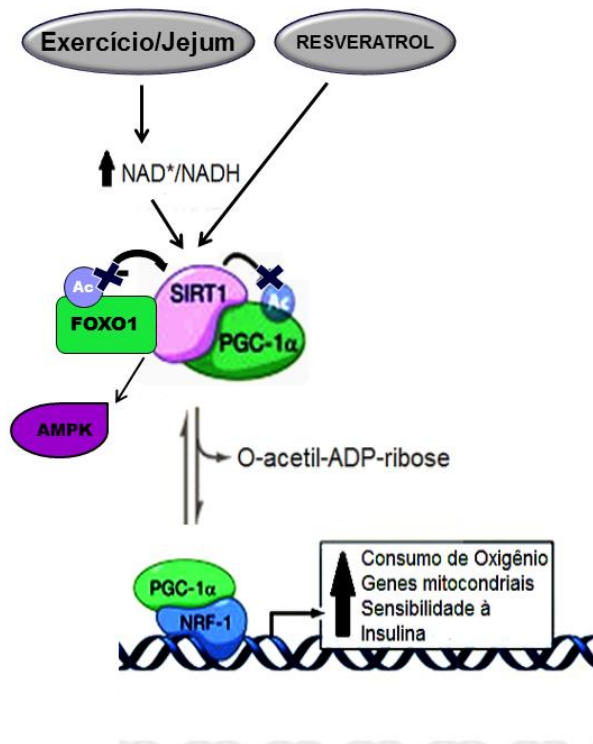


Figura 1a. Além de mediar diversos efeitos biológicos através da ativação da AMPK, a ativação da SIRT1 foi capaz de aumentar a atividade desacetilase de seus substratos FOXO1 e PGC1α a qual é considerado como principal regulador da biogênese mitocondrial e do metabolismo oxidativo em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético ³⁵.

Recentemente, demonstramos que agudamente o exercício físico aumentou a expressão da SIRT1 no músculo esquelético de ratos idosos, contribuindo com a melhora da sensibilidade à insulina ³². Diversos estudos revelaram que a superexpressão da SIRT1 em roedores é capaz de mimetizar muitos dos efeitos da restrição calórica, incluindo; menor incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas ³⁶⁻³⁸, câncer ^{39,40} e neurodegeneração ^{41,42}. Além disso, alguns estudos conduzidos em humanos demonstraram que os efeitos metabólicos

positivos promovidos pela restrição calórica, exercício físico e pelo resveratrol estão diretamente relacionados com a ativação da SIRT1 no músculo esquelético 33,34,43,44.

Embora nos últimos anos, muitos estudos tenham revelado estratégias promissoras com a finalidade de aumentar a atividade desacetilase da SIRT1, pouco se sabe como a atividade dessa molécula é controlada.

Modulação pós-transcricional de proteínas através da S-Nitrosação

A S-nitrosação vem sendo valorizada como uma das principais formas de modificação protéica induzida pelo óxido nítrico (NO), devido a sua alta reatividade, por ocorrer em condições fisiológicas, e devido a grande quantidade de processos celulares regulados por S-nitrosação descritos ao longo dos últimos anos⁴⁵. A S-nitrosação ocorre pela adição de um grupamento NO ao radical tiol (S-H) de um resíduo de cisteína, formando um nitrosotiol (S-NO). Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) é sintetizado a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina assim como ilustrado na figura 1b.

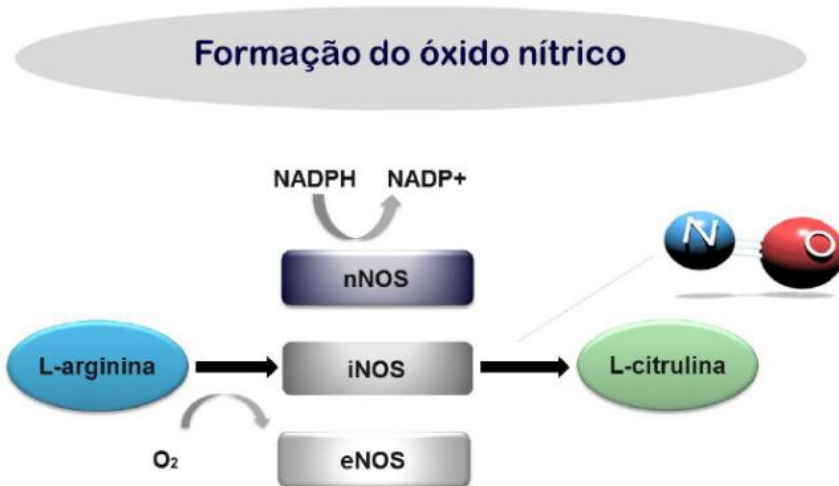


Figura 1b. As óxido nítrico sintases e a produção de óxido nítrico. As diferentes isoformas de óxido nítrico sintases catalisam a produção de óxido nítrico e L-citrulina a partir de L-arginina, oxigênio e de NADPH.

As NO-Sintases são as principais fontes intracelulares de NO e são divididas em 3 subtipos. A NO Sintase Neuronal (nNOS ou NOS 1) e a NO Sintase Endotelial (eNOS ou NOS 3) são cálcio dependentes e exercem funções biológicas importantes em seus respectivos tecidos, como regulação da apoptose neuronal, no caso da nNOS, e vasodilatação, no caso da eNOS ^{46,47}. A NO Sintase Induzível (iNOS ou NOS 2), não é cálcio dependente e pode ter sua expressão induzida a partir do estímulo com interleucinas ou lipopolissacarídeo (LPS). Uma vez produzido, o NO pode modificar a função proteica através de processos químicos distintos, que dependem principalmente da disponibilidade de espécies oxidantes e da concentração de NO liberada ⁴⁶.

Acredita-se que uma reação direta do radical NO com o grupamento tiol não leva a formação de um nitrosotiol ⁴⁸. Para tanto é necessária a oxidação do NO, após a reação com O₂, e formação de N₂O₃ ^{49,50}. Esta reação acontece provavelmente com mais facilidade no ambiente hidrófobo da membrana celular⁵¹, ou em microambientes hidrófobos dentro da própria estrutura proteica⁵², onde NO e O₂ podem existir em maiores concentrações. O N₂O₃ pode parcialmente dissociar-se em [ON..NO₂-], o que favorece a reação do radical nitrosonium (NO⁺) com o enxofre nucleofílico do grupamento tiol. Portanto a S-nitrosação pode ser entendida como uma transferência do radical nitrosonium e não do radical NO. Isto explica a possibilidade de acontecer trans-nitrosação, que é a S-nitrosação de um tiol diretamente por um nitrosotiol ⁵³⁻⁵⁵. Este segundo mecanismo de S-nitrosação tem importância biológica devido à alta concentração celular de tióis de massa molecular pequena, como a glutathione, por exemplo, que poderiam funcionar como transportadores do nitrosonium para outros ambientes celulares distantes daqueles onde a formação do NO a partir da NO-sintase aconteceu⁵⁶. Existem ainda outros modelos bioquímicos identificados in vitro para explicar a formação de nitrosotióis, como os obtidos a partir da doação de NO por nitrito⁵⁷, ou catalizada até mesmo por metaloproteínas ⁴⁵. Várias proteínas podem ter sua função modificada por S-nitrosação, como por exemplo, p21ras ⁵⁸, NF- κ B ⁵⁹ (Fator de transcrição kappa B), a família HIF (fatores induzidos por hipóxia) ⁶⁰, metaloproteinases matriciais⁶¹, e outras.

Nos últimos anos, nosso grupo se dedicou a investigar os efeitos da S-nitrosação das proteínas que compõem a via de transmissão de sinal da insulina

em modelos de obesidade ⁶²⁻⁶⁴. Em um desses estudos, foi demonstrado que o aumento da expressão da iNOS observada no músculo esquelético de roedores obesos induzidos por dieta rica em gordura, foi acompanhada da S-nitrosação do receptor de insulina (IR), do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e também da Akt ^{62,63}. Camundongos nocaute para a iNOS (iNOS^{-/-}), não apresentaram a S-nitrosação dessas proteínas e ficaram protegidos de desenvolver resistência à insulina mesmo quando expostos à dieta rica em gordura ⁶³. Dados similares em relação à S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1 e Akt no músculo esquelético foram observados em modelo experimental de envelhecimento ⁶⁵.

Recentemente, um elegante estudo conduzido por Kornberg e colaboradores demonstrou que em um sistema de cultura de células, a proteína Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (GAPDH) possui capacidade de se associar fisicamente à algumas enzimas nucleares, como; a histona desacetilase-2 (HDAC2), a proteína quinase ativada por DNA (DNA-PK) e a SIRT1. Essa associação foi determinante para a S-nitrosação dessas moléculas através de um mecanismo de transnitrosação ⁶⁶. Adicionalmente, os autores observaram que a S-nitrosação da SIRT1 promoveu aumento substancial da acetilação da PGC-1 α ⁶⁷. Coletivamente, esses dados sugerem que a atividade desacetilase da SIRT1 pode ser negativamente modulada através do mecanismo de S-nitrosação.

2. JUSTIFICATIVA

A redução da atividade desidrogenase da SIRT1 está diretamente relacionada com disfunção mitocôndria e com o fenômeno da resistência à insulina no músculo esquelético durante o processo de envelhecimento, contudo o mecanismo responsável pela diminuição da atividade da SIRT1 permanece incerto. Neste sentido, a caracterização da S-nitrosação da SIRT1 em modelos experimentais de envelhecimento torna-se de grande relevância científica. Acreditamos que a realização do atual estudo contribuirá de maneira significativa para o entendimento da disfunção mitocondrial e resistência à insulina observada durante o envelhecimento, abrindo novas perspectivas de tratamento.

3. HIPÓTESE

Será que a atividade da proteína SIRT1 no músculo esquelético pode ser negativamente modulada através do mecanismo da S-nitrosação em roedores?

A S-nitrosação da SIRT1 no músculo esquelético está relacionada à disfunção mitocondrial e resistência à insulina no envelhecimento em roedores?

Animais nocaute da iNOS são protegidos da resistência à insulina durante o processo de envelhecimento?

O uso de um inibidor farmacológico da iNOS restaura a atividade da SIRT1 no músculo esquelético e protege do fenômeno da S-nitrosação em camundongos idosos?

4. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do estudo foi avaliar a participação da iNOS sobre a S-nitrosação da SIRT1 em tecido muscular em modelo experimental de envelhecimento e relacionar esse fenômeno com a sensibilidade à insulina e a função mitocondrial.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão proteica da iNOS, a S-nitrosação da SIRT1, acetilação da FOXO1 e função mitocondrial no músculo gastrocnêmio em camundongos jovens e velhos.
- Avaliar o efeito do tratamento com o doador de NO, o GSNO, sobre a S-nitrosação da SIRT1, sobre a acetilação da PGC1 α e FOXO1 em camundongos jovens.
- Avaliar a S-nitrosação da SIRT1, acetilação da PGC1 α e FOXO1 e função mitocondrial em camundongos iNOS KO (iNOS -/-) velhos.
- Avaliar o efeito do tratamento com o farmacológico L-NIL sobre a S-nitrosação da SIRT1, acetilação da FOXO1 e função mitocondrial em camundongos velhos.

Inducible Nitric Oxide mediates the SIRT1 S-nitrosation in the Muscle of Aged Mice.

Luciene Lenhare², Carlos K. Katashima², Vagner R. R. Silva¹, Thayana O. Micheletti², Juliana A. de Camargo², Maria C. S. Mendes², Andrey dos Santos¹, Rodolfo Marinho¹, Gustavo D. Pimetel¹, Mario J. Saad², José B. C. Carvalheira², Dennys E. Cintra¹, José R. Pauli¹, Eduardo R. Ropelle¹⁻².

1. Laboratory of Molecular Biology of Exercise (LaBMEx). School of Applied Science, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil.
2. Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

Running head: iNOS induces Sirt1 S-nitrosation.

Key words: SIRT1, iNOS, S-nitrosation, muscle, aging.

Please address correspondence to:

Eduardo Rochete Ropelle, PhD.
School of Applied Sciences.
University of Campinas (UNICAMP),
Limeira, São Paulo, Brazil.
Phone: + 55 - 19 37016706
Email: eduardoropelle@gmail.com

ABSTRACT

SIRT1, an NAD⁺-dependent deacetylase, exerts a critical role on mitochondrial biogenesis, glucose homeostasis and insulin sensitivity. However, the post-translational mechanism that controls the SIRT1 activity remains unclear. Here we investigate the role of Nitric Oxide Synthase (iNOS) on SIRT1 S-nitrosation in muscle of old mice. First we identify high levels of iNOS protein levels in the skeletal muscle of aged mice and it was accompanied by the augment of SIRT1 S-nitrosation, PGC1 α and FOXO1 acetylation and impairment of mitochondrial biogenesis. We demonstrated that nitric oxide (NO) donor treatment induced SIRT1 S-nitrosation and reduced its deacetylase activity. Interestingly, iNOS knockout mice exhibited low levels of SIRT1 S-nitrosation and higher mitochondrial biogenesis during aging, when compared to wild type mice. Finally, we demonstrated that SIRT1 S-nitrosation is a reversible mechanism, once the iNOS pharmacological inhibitor (L-NIL) administration, reduced SIRT1 S-nitrosation and increase the activity of the SIRT1 substrates, including, PGC1 α , FOXO1 and AMPK in muscle of old mice. Collectively, our study provides substantial evidences that iNOS induces the SIRT1 S-nitrosation and it is associated with the impairment of mitochondrial function in the muscle of aged mice.

INTRODUCTION

Sirtuin 1 (SIRT1), the mammalian ortholog of yeast Sir2, is a highly conserved NAD⁺ - dependent protein deacetylase. SIRT1 activation is implicated in the prevention of many age-related diseases including type 2 diabetes, cardiovascular diseases, Alzheimer's disease and some types of cancer ¹. Furthermore, SIRT1 activation induced by caloric restriction leads lifespan extension in yeast ^{2,3}. Accumulating evidences have shown that SIRT1 mediates its biological effects inducing AMPK phosphorylation ⁴ and the deacetylation of some transcriptional regulators amongst them, PGC1 α , FOXO1 ^{6,7} and p53 ⁸. Specifically in skeletal muscle, the SIRT1 activity plays a critical role in the control of mitochondrial function and glucose metabolism, whereas SIRT1 activation induces mitochondrial biogenesis and protects against high-fat diet induced-insulin resistance ^{9,10,11,12}. Interestingly, SIRT1 activity and protein levels in the skeletal muscle suffer down regulation during obesity ^{13,14} or aging ^{15,16}. Thus, the understanding how SIRT1 activity is down regulated is important to prevent or treat aging-related diseases.

SIRT1 activity can be controlled by distinct mechanisms including modulations in its expression levels, changes in the availability of its substrates, post-translational modifications and direct interactions with other molecules ^{16,17,18,19,29}. SIRT1 can be also activated through an allosteric mechanism, whereas single amino acid in SIRT1, Glu²³⁰, is critical for activation of SIRT in response of diverse sirtuin-activating compounds ²¹. Additionally, the mutational analysis of

SIRT1 revealed that some cysteine residues in the catalytic domain are essential for the SIRT1 function^{20,22}. An elegant study demonstrated that the attachment of nitric oxide (NO) specifically in two cysteine residues, Cys³⁸⁷ and Cys³⁹⁰, is capable of modifying the deacetylase SIRT1 activity *in vitro*, through the mechanism called S-nitrosation²⁰. However the SIRT1 S-nitrosation *in vivo* and its physiological repercussion were not reported.

The S-nitrosation of proteins is as an essential mechanism for dynamic, post-translational modification of intracellular proteins in eukaryotic cells. S-nitrosation consists in the covalent attachment of NO with the thiol side chain in the cysteine residues of proteins to form S-nitrosothiol adducts, modifying the protein function²³. In this context, the inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) has a powerful impact on S-nitrosation induction, because it serves as main intracellular NO source, in particular under inflammatory circumstances^{24,25,26}. The augment of iNOS expression and S-nitrosation reaction were recently associated with insulin resistance in the skeletal muscle of obese²⁷ and aged rodents²⁸. Interestingly, the absence of iNOS leads to the increase of energy expenditure, mitochondrial biogenesis and insulin sensitivity in different models of obesity^{29,30,31}.

Considering that SIRT1 controls the mitochondrial biogenesis and the metabolic homeostasis and that NO can modulates SIRT1 activity, we hypothesized that iNOS could repress the SIRT1 deacetylase activity *in vivo* through the S-nitrosation mechanism in skeletal muscle of aged mice.

RESULTS

Effects of aging on iNOS protein levels and SIRT1 S-nitrosation in skeletal muscle of mice.

First we sought to evaluate the iNOS protein levels, SIRT1 S-nitrosation, mitochondrial makers in muscle of young and old C57BL6/J mice. First we observed that old mice were heavier than young group (Figure 1A). As expected, aging reduced the energy expenditure (Figure 1B), and physical activity pattern (Figure 1C).

Using the biotin switch method and Western blot assay, we identify the spontaneous augment of iNOS protein levels and SIRT1 S-nitrosation in gastrocnemius muscle of mice in a time-dependent manner (Figure 1D). To determine whether the S-nitrosation impairs the SIRT1 activity we monitored some SIRT1 substrates and mitochondrial biogenesis marker. Interestingly, SIRT1 S-nitrosation was accompanied by high levels of FOXO1 acetylation (Figure 1E) and the reduction of AMPK phosphorylation (Figure 1F). In parallel, low protein levels of mitochondrial components including the ubiquinol-cytochrome c reductase complex (Uqcrc1) and cytochrome c oxidase I (MTCO1) were found in muscle of old mice when compared to young animals (Figure 1G). Immunohistochemistry confirmed that aging reduced the mtDNA-encode MTCO1 in muscle of old mice (Figure 1H).

Nitric oxide reduces SIRT1 activity in muscle.

To determine the role of nitric oxide on SIRT1 S-nitrosation in muscle, GSNO (80 mg/Kg) was administrated via intraperitoneal during 3 consecutive 2 times per day in young C57BL6/J mice. GSNO induced SIRT1 S-nitrosation (Figure 2A) in the gastrocnemius muscle. To evaluate the SIRT1 activity after GSNO donor injections, we monitored different SIRT1 substrates. We found that SIRT1 S-nitrosation was accompanied by the increase of PGC1 α and FOXO1 acetylation and by the reduction of AMPK phosphorylation in the gastrocnemius muscle of mice (Figure 2B). This short GSNO treatment was also able to reduce the mRNA levels of some genes involved on oxidative metabolism, including *CPT1B*, *PPARalpha*, *PPARbeta* and *UCP2* (Figure 2C), demonstrating that NO induced a negative impact on SIRT1 activity and on mitochondrial metabolism that could contribute with insulin resistance in the skeletal muscle, as we previously demonstrated^{27,28}.

iNOS^{-/-} mice are protected against aging-induced SIRT1 S-nitrosation.

Next we employed a genetic model to confirm the role of iNOS on SIRT1 S-nitrosation in muscle during aging. iNOS knockout mice (iNOS^{-/-}) were examined after two years of age. We observed that iNOS^{-/-} mice presented lower weight gain after 24 months compared to wild type mice (Figure 3A). iNOS^{-/-} old mice also displayed lower food intake (Figure 3B), higher energy expenditure (Figure 3C) and physical activity (Figure 3D) compared to wild type mice.

Interestingly, iNOS^{-/-} mice are protected against aging-induced SIRT1 S-nitrosation in the skeletal muscle (Figure 3E). Consistent with this result, iNOS^{-/-} old mice exhibited low levels of PGC1 α and FOXO1 acetylation and the augment of AMPK phosphorylation, when compared to wild type old animals (Figure 3F). Moreover, Uqcrc1 and MTCO1 protein levels were increased in muscle of iNOS^{-/-} old mice when compared to the control old mice (Figure 3G). We also observed high MTCO1 staining in muscle from iNOS^{-/-} old mice compared to wild type (Figure 3H).

To check the physiological relevance of these results, when performed an endurance test in wild type and iNOS^{-/-} old mice. We observed that, iNOS^{-/-} old mice performed much better than wild type old mice on a treadmill endurance test (Figure 3I). These data demonstrated that iNOS is directly involved in SIRT1 impairment in the skeletal muscle during aging.

iNOS inhibitor reverses SIRT1 S-nitrosation in the muscle of old mice

Thereafter we develop a pharmacological approach to confirm the direct association between iNOS expression and SIRT1 S-nitrosation in muscle. Old mice were treated with the iNOS inhibitor, L-N₆-(1-iminoethyl) lysine (L-NIL), intraperitoneally for 3 days. The L-NIL treatment diminished the SIRT1 S-nitrosation in muscle of old mice (Figure 4A). This was accompanied by low levels of FOXO1 acetylation and the augment of AMPK phosphorylation (Figure 4B). The

pharmacological iNOS inhibition was sufficient to increase the protein levels of mitochondrial components Uqcrc1 and MTCO1 in gastrocnemius muscle of old mice (Figure 4C). These data demonstrated that that SIRT1 S-nitrosation is a reversible phenomenon.

DISCUSSION

In the present study we reported that nitric oxide plays an important role in the control of SIRT1 activity *in vivo* through the S-nitrosation mechanism. We identified that inducible nitric oxide synthase induces SIRT1 S-nitrosation in the skeletal muscle of mice. It was observed the elevation of both iNOS expression and SIRT1 S-nitrosation in the skeletal muscle of old mice. SIRT1 S-nitrosation was associated with mitochondrial dysfunction in muscle. Our findings revealed that pharmacological and genetic approaches targeting the iNOS activity/expression were sufficient to revert and prevent SIRT1 S-nitrosation, respectively, maintaining the mitochondrial function in the muscle of aged mice.

The maintenance of the skeletal muscle metabolism is critical to the human health. This tissue possesses notably mitochondrial density capable to induce the energy expenditure and utilizes either glucose or lipid to produce energy. In this context SIRT1 emerge as a core enzyme responsible to controls the mitochondrial biogenesis, fatty acid oxidation and glucose metabolism ³². SIRT1 exerts its metabolic function in the skeletal muscle reducing the PGC1 α acetylation. Thereafter, PGC1 α increases the mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation through its downstream targets ⁹.

PGC1 α activation also drives the formation of slow-twitch muscle fibers ³³. In addition, it has been proposed that SIRT1 and AMPK has a reciprocal effect whereas AMPK and SIRT1 can activate each other has a interdependence ⁴,

whereas SIRT1 promotes AMPK phosphorylation and AMPK mediates its biological effects through the SIRT1 activation^{34,35}.

It is important to note that under inflammatory conditions the SIRT1 deacetylase expression and/or activity are markedly affected in different tissues and cell types^{16,36,37,38}, however the molecular mechanism by which inflammation disrupts SIRT1 activity remains unclear. It has been proposed that the inflammatory process triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipocytes^{39,40}. In addition, in a preliminary study, Kaneki's group provided the first evidence that upon inflammatory stimulus, iNOS suppressed the SIRT1 activity in vitro, through the S-nitrosation mechanism²⁰. The utilization of NO donor confirmed that nitric oxide induces SIRT1 S-nitrosation, whereas the specific mutation in two cysteine residues, Cys³⁸⁷ and Cys³⁹⁰, abrogates the effects of GSNO on SIRT1 S-nitrosation *in vitro*²⁰. Our findings demonstrated that during low-grade inflammation conditions, such as aging, iNOS induced SIRT1 S-nitrosation impairing its activity in the skeletal muscle, contributing with mitochondrial dysfunction.

In the skeletal muscle all of three isoforms of NOS are expressed⁴¹. Interestingly, in our study, while iNOS expression was stimulated in muscle during the aging, both, endothelial and neuronal isoforms were downregulated, suggesting that iNOS has a critical participation on SIRT1 S-nitrosylation. The role of iNOS in the induction of S-nitrosation of proteins is relatively well documented. iNOS is associated with the S-nitrosation of proteins in models of chronic

inflammation, including obesity^{27,42}, aging²⁸, sepsis²⁶ and cancer⁴³. Our study demonstrated that in old mice, the chemical iNOS inhibition using L-NIL intraperitoneal treatment reduced the SIRT1 S-nitrosation in muscle, furthermore iNOS^{-/-} mice are protected against aging-induced SIRT1 S-nitrosation and mitochondrial dysfunction. Similar data were found in *ob/ob* mice lack iNOS. In accordance with our findings, Becerril and colleagues, previously reported that *ob/ob* mice lack iNOS presented higher energy expenditure and mitochondrial markers, including uncoupling proteins 1 and 3 (UCP-1 and UCP-3) in brown adipose tissue^{30,31}, confirming that aberrant iNOS expression has a negative impact in the energy expenditure and mitochondrial metabolism.

The role of NO in the control of mitochondrial function and biogenesis is broad and complex. Indeed NO has negative effect on mitochondrial respiratory capacity, as we observed in our models, however, we can't excluded that NO also reduces the mitochondrial function acting directly in mitochondrial complexes, once NO diffuses from cytosol to mitochondria and vice versa⁴⁴. It has been demonstrated that NO inhibits the electron transport chain at complex I, III and IV by distinct mechanisms^{45,46}. In the other hand, several studies have demonstrated that NO has a positive effect on mitochondrial biogenesis through the PGC1 α dependent mechanism^{47,48,49}, in our study it was observed that NO-donor, GSNO, increased the PGC1 α and FOXO acetylation and reduced the mitochondrial mRNA levels of genes involved in the oxidative metabolism in the muscle of mice. In line with our findings, other studies also found that nitric oxide promotes a downregulation of PGC1 α activity^{50,51}. Probably, these discrepancies are

associated with the different protocols and concentration of NO precursors used in each study, these information are important since that NO-donors or NOS chemical inhibitors induce dual effect that depends directly of their concentrations ⁴¹. Although our study has demonstrated that NO modulates the mitochondrial function and biogenesis in SIRT1-dependent manner, the interpretations of the effects of NO on mitochondrial metabolism must be made with reservation.

S-nitrosation of proteins is a reversible biological process frequently observed in several diseases or inflammatory conditions. Thus we and other have demonstrated that the treatment using iNOS inhibitors improves the metabolic profile, reducing the S-nitrosation of proteins, such as, Akt in models of obesity and aging ^{28,42,52,53}. In the present study, we hypothesized that targeted disruption of iNOS protects against SIRT1 S-nitrosation and metabolic disorders in muscle of aged mice.

To address if SIRT1 S-nitrosation is a reversible phenomenon, we demonstrated that iNOS inhibitor (L-NIL) was effective to revert SIRT1 S-nitrosation in muscle cells of old mice, increasing the mitochondrial biogenesis. Together, our results provide substantial evidences that S-nitrosation could be a common mechanism for the SIRT1 regulation and that iNOS inhibition represents a potential target to improve the mitochondrial function during aging.

METHODS

Animals

Animals. Male C57BL/6 and iNOS-null mice were purchased from Jackson Laboratory (C57BL/6-Nos2tm1Lau colony), aged 3 months (young) and 24 months (old). Animals had free access to standard rodent chow and water. The investigation was approved by the ethics committee and followed the university guidelines for the use of animals in experimental studies and experiments conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23 revised 1996).

Reagents and Antibodies

The reagents and apparatus for the gel of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) were Bio-Rad (Richmond, CA). Methane hydroxymethylamine (TRIS), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin and dithiothreitol (DTT) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Recombinant human insulin (Humulin®) Elli manufactured by Lilly Co. (Indianapolis, IN). The nitrocellulose membrane (BA85, 0,2.m) was used Schleicher & Schuell. The anti-SIRT1 (rabbit polyclonal, SC15404) PGC1 α anti-(rabbit polyclonal, SC13067), anti-iNOS (mouse monoclonal SC7271) anti-eNOS (rabbit polyclonal, SC654) anti-nNOS (rabbit polyclonal, SC648) antibodies ac. FKHR (polyclonal rabbit, SC49437) Uqcrc1 anti-(goat polyclonal SC69060) imported form the Santa Cruz

Technology (Santa Cruz, CA), anti-Acetyl Lysine (mouse monoclonal SC81623), the anti-Acetyl Lysine was imported from Rockland - USA . anti-AlphaTubulin (polyclonal rabbit # 2144), anti-FOXO1 (rabbit monoclonal, # C29H4) were imported from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA) and the anti-MTCO1 (mouse monoclonal, Ab 14795), anti-MTCO1 was imported from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, USA).

L-Nil treatment

L-N6-(l-iminoethyl) lysine (L-NIL) treatment. The animals received an intraperitoneal injection of L-NIL (100 mg/kg body weight) or PBS, twice daily for 3 days 2 times per day.

GSNO treatment

S-Nitrosoglutathione (GSNO) was prepared by the reaction of glutathione with sodium nitrite in acidic solution. The mice received an intraperitoneal (i.p.) injection of GSNO (0.1 mol l^{-1}) or phosphate-buffered saline every during 3 consecutive days 2 times per day.

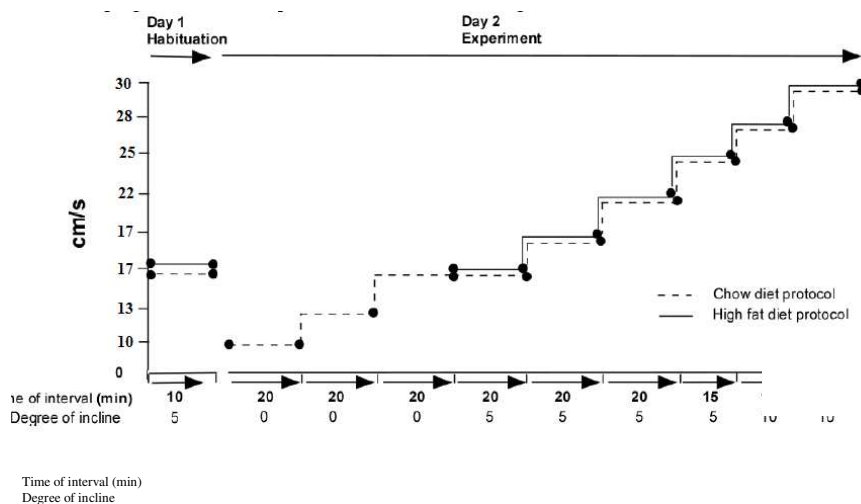
Endurance Test

Adapted protocol

An endurance test was performed on 2h fasted mice, using a variable speed belt treadmill enclosed in a plexiglass chamber with a stimulus device consisting of a shock grid attached to the rear of the belt (Panlab, Barcelona, Spain). Animals were acclimatized to the test using a habituation protocol the day preceding the running test.

For the test, the following incremental exercise protocol was used: the test started at a speed of 10 cm / s, with an inclination of 0 degrees. The distance traveled and the number of shocks obtained over 5 minute intervals were recorded and the mouse was considered exhausted and removed when received approximately 100 shocks over a period of 5 minutes⁹.

The following figure describes the protocol used for the test run:



Immunohistochemistry

To detect levels MTCO1 in skeletal muscle, microwave postfixation was carried out using a domestic oven (Panasonic Junior) at 700 W, which was delivered to slides immersed in 0.01 mol/l citrate buffer, pH 6.0, in two 7-min doses separated by a 2-min break, which allowed for buffer replenishment. The slides were allowed to cool to room temperature before being removed from the oven. Sections were then incubated at room temperature for 1 h with primary monoclonal mouse anti-MTCO1 (Ab 14795) which was imported from Upstate Biotechnology, (Charlottesville, VA, USA) (diluted 1:100). The anti-MTCO1 antibodies were applied overnight. The slides were then incubated with avidin-biotin complex LSAB+ Kit from Dako Cytomation (Carpinteria, CA, USA) for 30 min followed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as a substrate-chromogen solution. After hematoxylin counterstaining and dehydration, the slides were mounted in Entellan from Merck (Darmstadt, Germany). The experiments were performed at least in triplicate for each mouse.

mRNA Isolation and Real Time PCR

Muscular RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was rendered genomic DNA free by digestion with Rnase-free Dnase (RQ1,

Promega, Madison, WI, USA). Real time PCR and mRNA isolation were performed using a commercial kit.

Oxygen Consumption and Locomotor Activity Determination

Oxygen consumption and carbon dioxide production were measured in fed animals through a computer-controlled, open circuit calorimeter system LE405 Gas Analyzer (Panlab – Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Animals were singly housed in clear respiratory chambers and room air was passed through chambers at a flow rate of 10 times the respective weight of each animal. The air flow within each chamber was monitored by a sensor Air Supply & Switching (Panlab – Harvard Apparatus). Gas sensors were calibrated prior to the onset of experiments with primary gas standards containing known concentrations of O₂, CO₂ and N₂ (Air Liquid, Sao Paulo, Brazil). The analyses were performed in triplicates of 6 min for each chamber.

Therefore, each animal was evaluated for 24 hours. Outdoor air reference values were sampled after every four measurements. Sample air was sequentially passed through O₂ and CO₂ sensors to determine O₂ and CO₂ content, from which measures of oxygen consumption (VO₂) and carbon dioxide production (VCO₂) were estimated. The VO₂ and VCO₂ were calculated by Metabolism® 2.2v software and expressed in mL.g⁻¹.min⁻¹, based on Withers equation. The spontaneous locomotor activity was evaluated over a 24 h period using a computer-controlled detection system from Panlab – Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA.

Protein analysis by immunoblotting

As soon as anaesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, both portions of gastrocnemius (red and white fibres) were ablated, pooled, minced coarsely and homogenized immediately in extraction buffer (1% Triton X-100, 100 mm Tris, pH 7.4, containing 100 mm sodium pyrophosphate, 100 mm sodium fluoride, 10 mm EDTA, 10 mm sodium vanadate, 2 mm PMSF and 0.1 mg ml⁻¹ aprotinin) at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 30 s. The extracts were centrifuged at 9000 g and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Eppendorff) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants of these homogenates were used for protein quantification, performed by the Bradford method. Proteins were denatured by boiling in Laemmli sample buffer containing 100 mm DTT, run on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked and the specific primary and secondary antibodies were used to detect the protein of interest. Blots were exposed to preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at 80°C for 12–48 h. Band intensities were quantified by optical desitometry (Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD, USA) of the developed autoradiographs.

Detection of S-nitrosated proteins by the biotin-switch method

Muscle tissue was extracted and homogenized in extraction buffer (250 mm Hepes, pH 7.7, 1 mm EDTA, 0.1 mm neocuproine). After centrifugation at 9000 g

for 20 min, insoluble material was removed and extracts were adjusted to 0.5 mg ml⁻¹ of protein, and equal amounts were blocked with four volumes of blocking buffer (225 mM Hepes, pH 7.7, 0.9 mM neocuproine, 2.5% SDS, and 20 mM methylmethanethiosulphonate) at 50°C for 30 min with agitation. After blocking, extracts were precipitated with two volumes of cold acetone (-20°C), chilled at -20°C for 10 min, centrifuged at 2000 g at 4°C for 5 min, washed with acetone, dried out, and resuspended in 0.1 ml HENS buffer (250 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, and 1% SDS) per milligram of protein. Until this point, all operations were carried out in the dark. A one-third volume of biotin-HPDP 4 mM and 2.5 mM ascorbic acid was added and incubated for 1 h at room temperature. Proteins were acetone-precipitated again and resuspended in the same volume of HENS buffer.

For purification of biotinylated proteins, samples from the biotin-switch assay were diluted with two volumes of neutralization buffer (20 mM Hepes, pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100), and 15 µl neutravidin-agararose per milligram of protein in the initial extract was added and incubated for 1 h at room temperature with agitation. Beads were washed five times with washing buffer (20 mM Hepes, pH 7.7, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100) and incubated with elution buffer (20 mM Hepes, pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 100 mM 2-mercaptoethanol) for 20 min at 37°C with gentle stirring. Supernatants were collected, Laemmli buffer was added, and proteins were separated by SDS-PAGE.

Statistical analysis

All numeric results are expressed as the means $\pm$ SEM of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by optical densitometry (UN-SCAN-IT gel, 6.1). Statistical analysis was performed using the Student t test and ANOVA test with the Bonferroni post test. Significance was established at the $p < 0.05$ level.

REFERENCES

- 1 Sebastian, C., Satterstrom, F. K., Haigis, M. C. & Mostoslavsky, R. From sirtuin biology to human diseases: an update. *The Journal of biological chemistry* **287**, 42444-42452, doi:10.1074/jbc.R112.402768 (2012).
- 2 Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O. & Sinclair, D. A. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**, 181-185, doi:10.1038/nature01578 (2003).
- 3 Howitz, K. T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191-196, doi:10.1038/nature01960 (2003).
- 4 Canto, C. *et al.* Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell metabolism* **11**, 213-219, doi:10.1016/j.cmet.2010.02.006 (2010).
- 5 Rodgers, J. T. *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434**, 113-118, doi:10.1038/nature03354 (2005).
- 6 Motta, M. C. *et al.* Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* **116**, 551-563 (2004).
- 7 Brunet, A. A CRTCα link between energy and life span. *Cell metabolism* **13**, 358-360, doi:10.1016/j.cmet.2011.03.012 (2011).
- 8 Luo, J. *et al.* Negative control of p53 by Sir2α promotes cell survival under stress. *Cell* **107**, 137-148 (2001).

- 9 Lagouge, M. *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127**, 1109-1122, doi:10.1016/j.cell.2006.11.013 (2006).
- 10 Sun, C. *et al.* SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell metabolism* **6**, 307-319, doi:10.1016/j.cmet.2007.08.014 (2007).
- 11 Milne, J. C. *et al.* Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* **450**, 712-716, doi:10.1038/nature06261 (2007).
- 12 Feige, J. N. *et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell metabolism* **8**, 347-358, doi:10.1016/j.cmet.2008.08.017 (2008).
- 13 Coste, A. *et al.* The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1{alpha}. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17187-17192, doi:10.1073/pnas.0808207105 (2008).
- 14 Chen, L. L. *et al.* Resveratrol attenuates high-fat diet-induced insulin resistance by influencing skeletal muscle lipid transport and subsarcolemmal mitochondrial beta-oxidation. *Metabolism: clinical and experimental* **60**, 1598-1609, doi:10.1016/j.metabol.2011.04.002 (2011).
- 15 Nogalska, A., D'Agostino, C., Engel, W. K., Davies, K. J. & Askanas, V. Decreased SIRT1 deacetylase activity in sporadic inclusion-body myositis

- muscle fibers. *Neurobiology of aging* **31**, 1637-1648, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.021 (2010).
- 16 Pauli, J. R. *et al.* Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. *Mechanisms of ageing and development* **131**, 323-329, doi:10.1016/j.mad.2010.03.004 (2010).
 - 17 Guarente, L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* **132**, 171-176, doi:10.1016/j.cell.2008.01.007 (2008).
 - 18 Haigis, M. C. & Sinclair, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annual review of pathology* **5**, 253-295, doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250 (2010).
 - 19 Houtkooper, R. H., Canto, C., Wanders, R. J. & Auwerx, J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine reviews* **31**, 194-223, doi:10.1210/er.2009-0026 (2010).
 - 20 Kornberg, M. D. *et al.* GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nature cell biology* **12**, 1094-1100, doi:10.1038/ncb2114 (2010).
 - 21 Hubbard, B. P. *et al.* Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* **339**, 1216-1219, doi:10.1126/science.1231097 (2013).
 - 22 Chen, L. *et al.* Dual role of Zn²⁺ in maintaining structural integrity and suppressing deacetylase activity of SIRT1. *Journal of inorganic biochemistry* **104**, 180-185, doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.10.021 (2010).
 - 23 Benhar, M., Forrester, M. T. & Stamler, J. S. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 721-732, doi:10.1038/nrm2764 (2009).

- 24 Nathan, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *The Journal of clinical investigation* **100**, 2417-2423, doi:10.1172/JCI119782 (1997).
- 25 Mitchell, D. A., Erwin, P. A., Michel, T. & Marletta, M. A. S-Nitrosation and regulation of inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* **44**, 4636-4647, doi:10.1021/bi0474463 (2005).
- 26 Carvalho-Filho, M. A., Ueno, M., Carvalheira, J. B., Velloso, L. A. & Saad, M. J. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **291**, E476-482, doi:10.1152/ajpendo.00422.2005 (2006).
- 27 Carvalho-Filho, M. A. *et al.* S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* **54**, 959-967 (2005).
- 28 Ropelle, E. R. *et al.* Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes* **62**, 466-470, doi:10.2337/db12-0339 (2013).
- 29 Perreault, M. & Marette, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature medicine* **7**, 1138-1143, doi:10.1038/nm1001-1138 (2001).
- 30 Becerril, S. *et al.* Transcriptional analysis of brown adipose tissue in leptin-deficient mice lacking inducible nitric oxide synthase: evidence of the role of Med1 in energy balance. *Physiological genomics* **44**, 678-688, doi:10.1152/physiolgenomics.00039.2012 (2012).

- 31 Becerril, S. *et al.* Deletion of inducible nitric-oxide synthase in leptin-deficient mice improves brown adipose tissue function. *PloS one* **5**, e10962, doi:10.1371/journal.pone.0010962 (2010).
- 32 Yu, J. & Auwerx, J. The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1173 Suppl 1**, E10-19, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04952.x (2009).
- 33 Lin, J. *et al.* Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801, doi:10.1038/nature00904 (2002).
- 34 Price, N. L. *et al.* SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell metabolism* **15**, 675-690, doi:10.1016/j.cmet.2012.04.003 (2012).
- 35 Canto, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056-1060, doi:10.1038/nature07813 (2009).
- 36 Breitenstein, A. *et al.* Peripheral blood monocyte Sirt1 expression is reduced in patients with coronary artery disease. *PloS one* **8**, e53106, doi:10.1371/journal.pone.0053106 (2013).
- 37 Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E. J. & Hall, D. J. Regulation of cartilage-specific gene expression in human chondrocytes by SirT1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **283**, 36300-36310, doi:10.1074/jbc.M803196200 (2008).
- 38 Alamdari, N., Smith, I. J., Aversa, Z. & Hasselgren, P. O. Sepsis and glucocorticoids upregulate p300 and downregulate HDAC6 expression and

- activity in skeletal muscle. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **299**, R509-520, doi:10.1152/ajpregu.00858.2009 (2010).
- 39 Chalkiadaki, A. & Guarente, L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell metabolism* **16**, 180-188, doi:10.1016/j.cmet.2012.07.003 (2012).
 - 40 Serrano-Marco, L. *et al.* TNF-alpha inhibits PPARbeta/delta activity and SIRT1 expression through NF-kappaB in human adipocytes. *Biochimica et biophysica acta* **1821**, 1177-1185, doi:10.1016/j.bbalip.2012.05.006 (2012).
 - 41 Tengan, C. H., Rodrigues, G. S. & Godinho, R. O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *International journal of molecular sciences* **13**, 17160-17184, doi:10.3390/ijms131217160 (2012).
 - 42 Pauli, J. R. *et al.* Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol* **586**, 659-671, doi:10.1113/jphysiol.2007.142414 (2008).
 - 43 Tian, H. *et al.* MDA-7/IL-24 induces Bcl-2 denitrosylation and ubiquitin-degradation involved in cancer cell apoptosis. *PloS one* **7**, e37200, doi:10.1371/journal.pone.0037200 (2012).
 - 44 Moncada, S. & Erusalimsky, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 214-220, doi:10.1038/nrm762 (2002).

- 45 Boveris, A., Costa, L. E., Poderoso, J. J., Carreras, M. C. & Cadenas, E. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences* **899**, 121-135 (2000).
- 46 Cooper, C. E. Competitive, reversible, physiological? Inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by nitric oxide. *IUBMB life* **55**, 591-597, doi:10.1080/15216540310001628663 (2003).
- 47 Lira, V. A. *et al.* Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 in skeletal muscle cells. *The Journal of physiology* **588**, 3551-3566, doi:10.1113/jphysiol.2010.194035 (2010).
- 48 Nisoli, E. *et al.* Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16507-16512, doi:10.1073/pnas.0405432101 (2004).
- 49 McConell, G. K. *et al.* Central role of nitric oxide synthase in AICAR and caffeine-induced mitochondrial biogenesis in L6 myocytes. *J Appl Physiol (1985)* **108**, 589-595, doi:10.1152/japplphysiol.00377.2009 (2010).
- 50 Borniquel, S. *et al.* Inactivation of Foxo3a and subsequent downregulation of PGC-1 alpha mediate nitric oxide-induced endothelial cell migration. *Molecular and cellular biology* **30**, 4035-4044, doi:10.1128/MCB.00175-10 (2010).
- 51 Borniquel, S., Valle, I., Cadenas, S., Lamas, S. & Monsalve, M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB journal : official publication of the*

Federation of American Societies for Experimental Biology **20**, 1889-1891, doi:10.1096/fj.05-5189fje (2006).

- 52 Carvalho-Filho, M. A. *et al.* Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibiting inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IRbeta/IRS-1 and Akt. *Diabetologia* **52**, 2425-2434, doi:10.1007/s00125-009-1498-1 (2009).
- 53 Fujimoto, M. *et al.* A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* **54**, 1340-1348 (2005).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Evaluation of iNOS protein levels and SIRT1 S-nitrosation in muscle of old mice. Total body weight (BW) (A), energy expenditure (B), spontaneous physical activity (C). iNOS protein levels and SIRT1 S-nitrosation in muscle of old mice (D), FOXO1 acetylation (E), AMPK phosphorylation (F), Uqcrc1 and MTCO1 protein levels (G) and MTCO1 staining in muscle of young and old mice (H). The bars represent the mean SEM of 5–8 mice. Student t test was used. *P < 0.05 vs. the respective young group.

Figure 2. Effect of GSNO on SIRT1 S-nitrosation in muscle of mice. SIRT1 S-nitrosation in gastrocnemius muscle after GSNO intraperitoneal treatment (A), PGC1 α and FOXO1 acetylation and AMPK phosphorylation (B). mRNA levels in gastrocnemius muscle of mice after GSNO treatment (C). The bars represent the mean SEM of 5–8 mice. Student t test was used. *P < 0.05 vs. the respective control group.

Figure 3. Evaluation of SIRT1 S-nitrosation in muscle of iNOS^{-/-}. Total body weight (BW) (A), food consumption (B), energy expenditure (C), spontaneous physical activity (D). SIRT1 S-nitrosation in muscle of old mice (E), PGC1 α and FOXO1 acetylation and AMPK phosphorylation (F), Uqcrc1 and MTCO1 protein levels (G) MTCO1 staining in muscle of wild type and iNOS^{-/-} mice (H) and greater distance

traveled in iNOS^{-/-} (I). The bars represent the mean SEM of 5–8 mice. Student t test was used. *P < 0.05 vs. the respective young group.

Figure 4. Effect of L-NIL on SIRT1 S-nitrosation in muscle of old mice. SIRT1 S-nitrosation in muscle of old mice after L-NIL treatment (A), FOXO1 acetylation and AMPK phosphorylation (G), Uqcrc1 and MTCO1 protein levels (H) and MTCO1 staining in muscle gastrocnemius muscle. The bars represent the mean SEM of 5–8 mice. Student t test was used. *P < 0.05 vs. the respective young group.

FIGURES

Figure 1

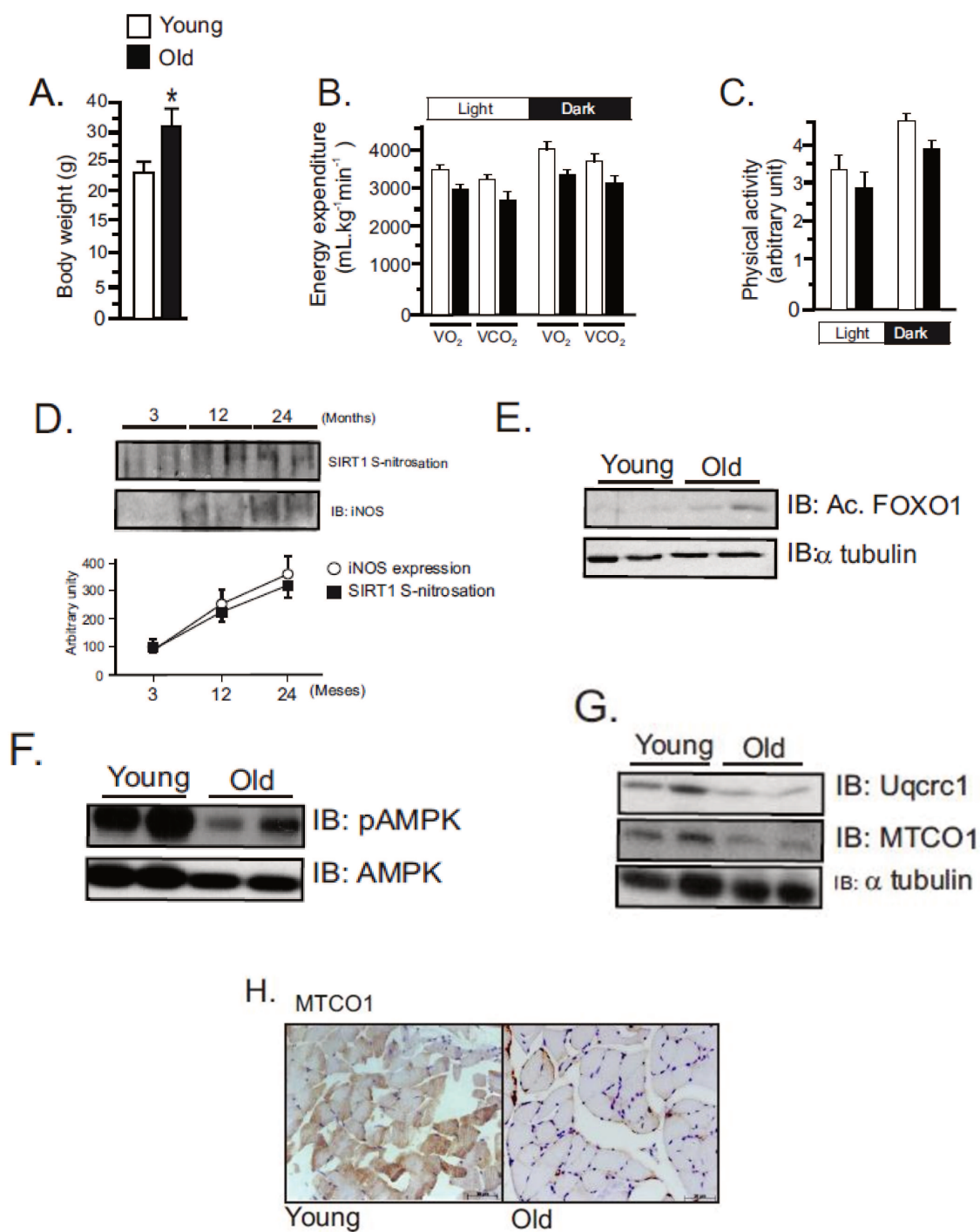


Figure 2

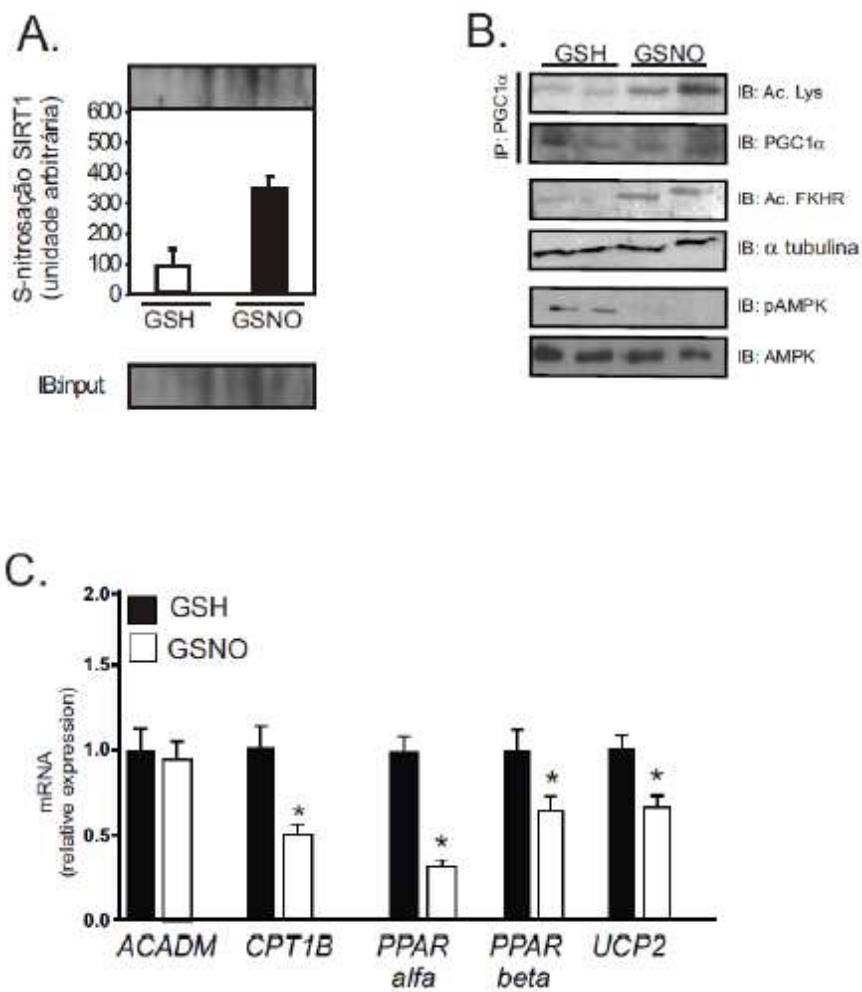


Figure 3

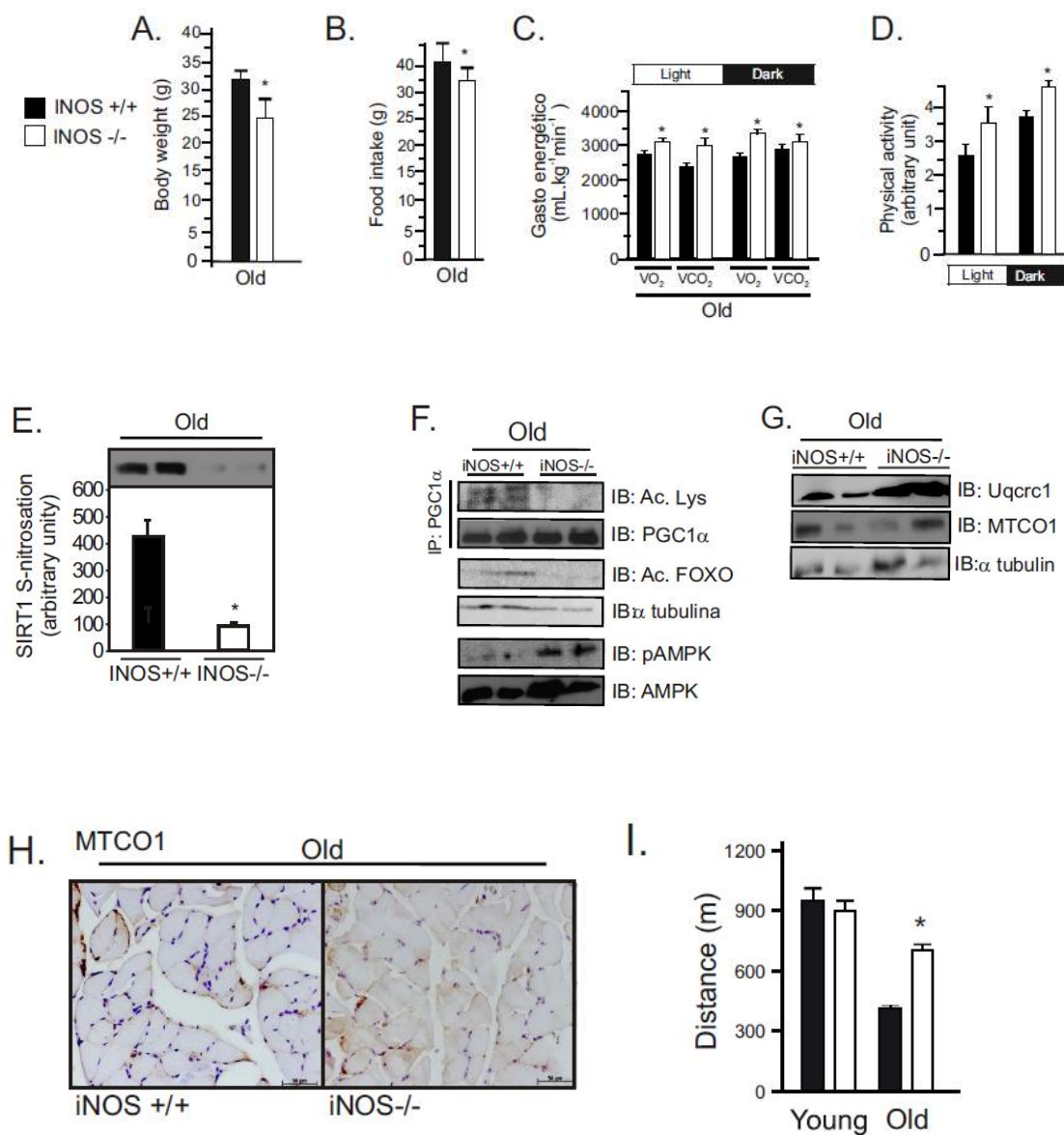
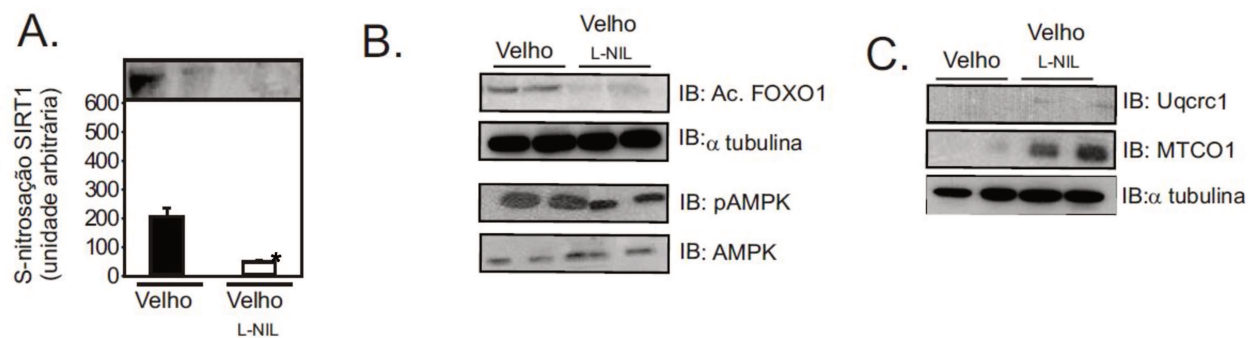


Figure 4



CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo observou-se que o aumento dos níveis proteicos da iNOS no músculo esquelético está diretamente relacionado a redução da atividade da SIRT1 em modelo experimental de envelhecimento. Observou-se que a ação supressora da iNOS sobre a SIRT1 ocorre através do mecanismo de S-nitrosação. Demonstrou-se ainda que na sua forma nitrosada, a SIRT1 perde sua capacidade de desacetilar seus substratos, incluindo a PGC1 α e a FOXO1. O desfecho desse evento celular no músculo esquelético é a redução da biogênese mitocondrial. Observamos que a administração de GSNO foi capaz de reduzir a atividade da SIRT1 no músculo. Em modelo experimental de envelhecimento, animais nocaute para a iNOS apresentaram baixos níveis da S-nitrosação da SIRT1, melhor perfil mitocondrial e possivelmente maior sensibilidade à insulina quando comparado aos animais do grupo controle. Por fim, demonstramos que a inibição da atividade da iNOS através do uso intraperitoneal de L-NIL, foi suficiente para reduzir a S-nitrosação da SIRT1 no musculo de animais idosos, bem como a quantidade de marcadores mitocondriais (Uqcrc1 e MTCO1). Coletivamente, esses dados sugerem que a redução da atividade desacetilase da SIRT1 durante o envelhecimento, está ao menos em parte relacionada ao aumento dos níveis de iNOS no musculo esquelético.

REFERÊNCIAS

- 1 Elahi, D. & Muller, D. C. Carbohydrate metabolism in the elderly. *Eur J Clin Nutr* **54 Suppl 3**, S112-120 (2000).
- 2 Nair, K. S. Aging muscle. *Am J Clin Nutr* **81**, 953-963 (2005).
- 3 Scheen, A. J. Diabetes mellitus in the elderly: insulin resistance and/or impaired insulin secretion? *Diabetes Metab* **31 Spec No 2**, 5S27-25S34 (2005).
- 4 DeFronzo, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* **88**, 787-835, ix (2004).
- 5 Scheen, A. J. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg* **58**, 335-341 (2003).
- 6 Meneilly, G. S. & Tessier, D. Diabetes in elderly adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**, M5-13 (2001).
- 7 Smith, A. G. & Muscat, G. E. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2047-2063, doi:10.1016/j.biocel.2005.03.002 (2005).
- 8 Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V. & Ritov, V. B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944-2950 (2002).
- 9 Kim, J. Y., Hickner, R. C., Cortright, R. L., Dohm, G. L. & Houmard, J. A. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E1039-1044 (2000).

- 10 Frontera, W. R., Zayas, A. R. & Rodriguez, N. Aging of human muscle: understanding sarcopenia at the single muscle cell level. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* **23**, 201-207, xiii, doi:10.1016/j.pmr.2011.11.012 (2012).
- 11 Short, K. R. *et al.* Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5618-5623, doi:10.1073/pnas.0501559102 (2005).
- 12 Hiona, A. & Leeuwenburgh, C. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Experimental gerontology* **43**, 24-33, doi:10.1016/j.exger.2007.10.001 (2008).
- 13 Marzetti, E. *et al.* Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mechanisms of ageing and development* **129**, 542-549, doi:10.1016/j.mad.2008.05.005 (2008).
- 14 Lambert, A. J. & Brand, M. D. Research on mitochondria and aging, 2006-2007. *Aging cell* **6**, 417-420, doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00316.x (2007).
- 15 Pan, D. A. *et al.* Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* **46**, 983-988 (1997).
- 16 Simoneau, J. A. & Kelley, D. E. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* **83**, 166-171 (1997).

- 17 Handschin, C. & Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocrine reviews* **27**, 728-735, doi:10.1210/er.2006-0037 (2006).
- 18 Baker, D. J., Betik, A. C., Krause, D. J. & Hepple, R. T. No decline in skeletal muscle oxidative capacity with aging in long-term calorically restricted rats: effects are independent of mitochondrial DNA integrity. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **61**, 675-684 (2006).
- 19 Sandri, M. *et al.* PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16260-16265, doi:10.1073/pnas.0607795103 (2006).
- 20 Wenz, T., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., Spiegelman, B. M. & Moraes, C. T. Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20405-20410, doi:10.1073/pnas.0911570106 (2009).
- 21 Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124, doi:10.1016/S0092-8674(00)80611-X (1999).
- 22 Gurd, B. J. Deacetylation of PGC-1alpha by SIRT1: importance for skeletal muscle function and exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Applied*

- physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* **36**, 589-597, doi:10.1139/h11-070 (2011).
- 23 Nakamura, Y. *et al.* A huge coronary aneurysm resulting from a coronary artery-to-left ventricle fistula. *Intern Med* **37**, 366-369 (1998).
 - 24 Guarente, L. & Picard, F. Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* **120**, 473-482, doi:10.1016/j.cell.2005.01.029 (2005).
 - 25 Rodgers, J. T. *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434**, 113-118, doi:10.1038/nature03354 (2005).
 - 26 Motta, M. C. *et al.* Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* **116**, 551-563 (2004).
 - 27 Brunet, A. A CRTCα link between energy and life span. *Cell metabolism* **13**, 358-360, doi:10.1016/j.cmet.2011.03.012 (2011).
 - 28 Luo, J. *et al.* Negative control of p53 by Sir2α promotes cell survival under stress. *Cell* **107**, 137-148 (2001).
 - 29 Gerhart-Hines, Z. *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1α. *EMBO J* **26**, 1913-1923, doi:10.1038/sj.emboj.7601633 (2007).
 - 30 Scarpulla, R. C. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: Integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbagrm.2011.10.011 (2011).
 - 31 Lagouge, M. *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1α. *Cell* **127**, 1109-1122, doi:10.1016/j.cell.2006.11.013 (2006).

- 32 Pauli, J. R. *et al.* Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. *Mech Ageing Dev* **131**, 323-329, doi:10.1016/j.mad.2010.03.004 (2010).
- 33 Canto, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056-1060, doi:10.1038/nature07813 (2009).
- 34 Price, N. L. *et al.* SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. *Cell metabolism* **15**, 675-690, doi:10.1016/j.cmet.2012.04.003 (2012).
- 35 Petsko, G. A. The new Manichaeans. *Genome biology* **9**, 105, doi:10.1186/gb-2008-9-5-105 (2008).
- 36 Banks, A. S. *et al.* SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell metabolism* **8**, 333-341, doi:10.1016/j.cmet.2008.08.014 (2008).
- 37 Bordone, L. *et al.* SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* **6**, 759-767, doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00335.x (2007).
- 38 Pfluger, P. T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M. & Tschop, M. H. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9793-9798, doi:10.1073/pnas.0802917105 (2008).
- 39 Herranz, D. *et al.* Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* **1**, 3, doi:10.1038/ncomms1001 (2010).

- 40 Oberdoerffer, P. *et al.* SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* **135**, 907-918, doi:10.1016/j.cell.2008.10.025 (2008).
- 41 Donmez, G., Wang, D., Cohen, D. E. & Guarente, L. SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell* **142**, 320-332, doi:10.1016/j.cell.2010.06.020 (2010).
- 42 Qin, W. *et al.* Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem* **281**, 21745-21754, doi:10.1074/jbc.M602909200 (2006).
- 43 Timmers, S. *et al.* Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell metabolism* **14**, 612-622, doi:10.1016/j.cmet.2011.10.002 (2011).
- 44 Kume, S., Uzu, T., Kashiwagi, A. & Koya, D. SIRT1, a calorie restriction mimetic, in a new therapeutic approach for type 2 diabetes mellitus and diabetic vascular complications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **10**, 16-24 (2010).
- 45 Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 150-166, doi:10.1038/nrm1569 (2005).
- 46 Davis, K. L., Martin, E., Turko, I. V. & Murad, F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 203-236, doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.203 (2001).

- 47 Foster, M. W., McMahon, T. J. & Stamler, J. S. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* **9**, 160-168 (2003).
- 48 Wink, D. A., Nims, R. W., Saavedra, J. E., Utermahlen, W. E., Jr. & Ford, P. C. The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6604-6608 (1994).
- 49 Wink, D. A., Darbyshire, J. F., Nims, R. W., Saavedra, J. E. & Ford, P. C. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* **6**, 23-27 (1993).
- 50 Hogg, P. J. Biological regulation through protein disulfide bond cleavage. *Redox Rep* **7**, 71-77, doi:10.1179/135100002125000299 (2002).
- 51 Liu, H., Miller, E., van de Water, B. & Stevens, J. L. Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca²⁺ increases and cell death. *J Biol Chem* **273**, 12858-12862 (1998).
- 52 Nedospasov, A., Rafikov, R., Beda, N. & Nudler, E. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13543-13548, doi:10.1073/pnas.250398197 (2000).
- 53 Arnette, D. R. & Stamler, J. S. NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* **318**, 279-285, doi:10.1006/abbi.1995.1231 (1995).

- 54 Liu, Z., Rudd, M. A., Freedman, J. E. & Loscalzo, J. S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* **284**, 526-534 (1998).
- 55 Hogg, N. The kinetics of S-transnitrosation--a reversible second-order reaction. *Anal Biochem* **272**, 257-262, doi:10.1006/abio.1999.4199 (1999).
- 56 Martinez-Ruiz, A. & Lamas, S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res* **62**, 43-52, doi:10.1016/j.cardiores.2004.01.013 (2004).
- 57 Stamler, J. S. *et al.* S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8087-8091 (1992).
- 58 Williams, J. G., Pappu, K. & Campbell, S. L. Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6376-6381, doi:10.1073/pnas.1037299100 (2003).
- 59 Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* **40**, 1688-1693 (2001).
- 60 Brune, B. & Zhou, J. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Curr Med Chem* **10**, 845-855 (2003).
- 61 Gu, Z. *et al.* S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* **297**, 1186-1190, doi:10.1126/science.1073634 (2002).

- 62 Carvalho-Filho, M. A. *et al.* S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* **54**, 959-967 (2005).
- 63 Carvalho-Filho, M. A. *et al.* Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibiting inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IRbeta/IRS-1 and Akt. *Diabetologia* **52**, 2425-2434, doi:10.1007/s00125-009-1498-1 (2009).
- 64 Pauli, J. R. *et al.* Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol* **586**, 659-671, doi:10.1113/jphysiol.2007.142414 (2008).
- 65 Ropelle, E. R. *et al.* Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes* **62**, 466-470, doi:10.2337/db12-0339 (2013).
- 66 Kornberg, M. D. *et al.* GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nature cell biology* **12**, 1094-1100, doi:10.1038/ncb2114 (2010).