



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUCIENE LENHARE REMÉDIO

**EFEITO DA OBESIDADE SOBRE A S-NITROSAÇÃO DA SIRT1 NO TECIDO
HEPÁTICO E NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS.**

***EFFECT OF OBESITY ON SIRT1 S-NITROSYLATION IN HEPATIC TISSUE AND
SKELETAL MUSCLE OF MICE.***

CAMPINAS

2018

LUCIENE LENHARE REMÉDIO

**EFEITO DA OBESIDADE SOBRE A S-NITROSAÇÃO DA SIRT1 NO TECIDO
HEPÁTICO E NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS**

***EFFECT OF OBESITY ON SIRT1 S-NITROSYLATION IN HEPATIC TISSUE AND
SKELETAL MUSCLE OF MICE.***

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em
Ciências na Área de Clínica Médica.**

*Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the State
University of Campinas as part of the requirements required to
obtain the Doctor in Science, Clinical Medical Area.*

ORIENTADOR: Prof. DR. EDUARDO ROCHETE ROPELLE

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA LUCIENE LENHARE REMÉDIO, E ORIENTADO PELO PROF. DR.
EDUARDO ROCHETE ROPELLE.**

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 4570/2018
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4379-0471>

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

R282e Remédio, Luciene Lenhare, 1984-
Efeito da obesidade sobre a s-nitrosação da SIRT1 no tecido hepático e no músculo esquelético de camundongos / Luciene Lenhare Remédio. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Eduardo Rochete Ropelle.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sirtuína 1. 2. Músculos. 3. Fígado. 4. Obesidade. 5. Exercício. I. Ropelle, Eduardo Rochete, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of obesity on SIRT1 s-nitrosylation in hepatic tissue and skeletal muscle of mice

Palavras-chave em inglês:

Sirtuin 1
Muscles
Liver
Obesity
Exercise

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Eduardo Rochete Ropelle [Orientador]
Adelino Sanchez Ramos da Silva
Guilherme Zweig Rocha
Leandro Pereira de Moura
Michel Barbosa de Araújo

Data de defesa: 31-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LUCIENE LENHARE REMÉDIO

ORIENTADOR: EDUARDO ROCHETE ROPELLE

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. EDUARDO ROCHETE ROPELLE**
 - 2. PROF. DR. ADELINO SANCHEZ RAMOS DA SILVA**
 - 3. PROF. DR. GUILHERME ZWEIG ROCHA**
 - 4. PROF. DR. LEANDRO PEREIRA DE MOURA**
 - 5. PROF. DR. MICHEL BARBOSA DE ARAÚJO**
-

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 31 de agosto de 2018

DEDICATÓRIA

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

EPÍGRAFE

*“Devemos aprender durante toda a vida sem imaginar que a sabedoria vem com a velhice” **Platão.***

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES).

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida, e por me guiar em todos meus passos.

A minha família, por estarem sempre ao meu lado, motivando e 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 aos professores Rodrigo Pauli, Leandro Moura e Dennys Cintra pela oportunidade que me deram em ver a ciência através de um outro olhar.

Aos meus companheiros de trabalho, Vagner, Barbara, André, Renata, Rafael, Carlos, Juliana e Sandrinha obrigada pela amizade, fica aqui documentado o meu carinho e minha eterna gratidão.

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

RESUMO

A proteína desacetilase SIRT1 desempenha um papel crucial no metabolismo celular. Sabe-se que durante a obesidade a atividade da SIRT1 é reduzida e esse efeito pode contribuir no desenvolvimento de distúrbios metabólicos. Estudos envolvendo a perda ou ganho de função da SIRT1 consideraram esta proteína como uma molécula crucial para o metabolismo hepático e muscular melhorando a sensibilidade à insulina, regulando as funções metabólicas como homeostase, lipogênese, a síntese de proteínas, gliconeogênese através de sua atividade deacetilase, contudo, pouco se sabe como ocorre o controle da atividade desta proteína. Paralelamente, a S-nitrosação de proteínas vem sendo valorizada como uma das principais formas de modificação de atividade proteica induzida pelo Óxido Nítrico (NO). O NO possui capacidade de se ligar a resíduos de cisteínas de diversas proteínas intracelulares, modificando suas funções através do fenômeno conhecido com S-nitrosação. No entanto, o efeito da S-nitrosação sobre a atividade da SIRT1 no fígado e músculo esquelético é desconhecido. **OBJETIVO:** Avaliar a S-nitrosação da SIRT1 em tecido hepático e muscular de roedores obesos. **MÉTODOS:** Para o estudo 1, testes fisiológicos foram combinados às técnicas de *Western blot*, imunofluorescência e ao método de avaliação da S-nitrosação de proteínas, para a análise do tecido muscular e hepático em camundongos C57BL/6J e iNOS^{-/-} submetidos à dieta hiperlipídica, camundongos obesos (*ob/ob*) e camundongos C57BL/6J que receberam injeção intraperitoneal do doador de óxido nítrico, o GSNO. Para o estudo 2, os ensaios foram utilizados para avaliar o efeito do exercício físico sobre a S-nitrosação da SIRT1 no músculo de camundongos C57BL/6J obesos. A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$. **RESULTADOS:** A administração de GSNO resultou na S-nitrosação da SIRT1. Esse fenômeno foi acompanhado do aumento da acetilação global de proteínas e redução da pAMPK, no fígado e músculo gastrocnêmio. De forma interessante, animais obesos induzidos por dieta e camundongos *ob/ob* apresentaram aumento significativo do conteúdo proteico da iNOS e da S-nitrosação da SIRT1 no fígado e no músculo. Foi possível observar a co-localização de iNOS e SIRT1 em amostras de fígado e músculo de animais obesos. Por outro lado, animais iNOS^{-/-} apresentaram menores níveis de S-nitrosação da SIRT1 tanto no fígado quanto no gastrocnêmio. Esses dados foram acompanhados de um fenótipo de obesidade mais brando. O treinamento físico foi

capaz de reverter/prevenir a S-nitrosação da SIRT1 nos camundongos obesos mantendo o conteúdo de SIRT1 e função mitocondrial acompanhado de uma redução na acetilação nos tecidos em questão. **CONCLUSÃO:** A atividade desacetilase da SIRT1 na obesidade está, ao menos em parte, relacionada ao aumento dos níveis de iNOS favorecendo a manifestação do mecanismo da S-nitrosação no tecido hepático e músculo esquelético.

Palavras-chave: Sirtuína 1; músculo; fígado; obesidade; exercício.

ABSTRACT

The deacetylase protein SIRT1 plays a crucial role in cellular metabolism. It is known that during obesity the activity of SIRT1 is reduced and this effect may contribute to the development of metabolic disorders. Studies involving the loss or gain of function of SIRT1 consider this protein such as a crucial molecule for hepatic and muscular metabolism improving insulin sensitivity, regulating metabolic functions such as homeostasis, lipogenesis, protein synthesis and, gluconeogenesis through its deacetylation, however, little is known how the control of the activity of this protein occurs. In parallel, S-nitrosylation of proteins has been valued as one of the main ways of modifying protein activity induced by nitric oxide (NO). NO has the ability to bind to cysteine residues from various intracellular proteins, modifying their functions through the phenomenon known as S-nitrosylation. However, the effect of S-nitrosylation on the activity of SIRT1 in liver and skeletal muscle is unknown.

PURPOSE: To evaluate the S-nitrosylation of SIRT1 in hepatic and muscular tissue of obese rodents. **METHODS:** For study 1, physiological tests were combined with Western blot, Immunofluorescence and S-nitrosylation method for the analysis of muscle and liver tissue iNOS^{-/-} mice submitted to the hyperlipidic diet obese mice (ob/ob) and C57BL/6J mice receiving intraperitoneal injection of the nitric oxide donor, GSNO. For study 2, the same trials were used to evaluate the effect of physical exercise on S-nitrosylation of SIRT1 in the muscle of obese C57BL/6J mice. The statistical significance was set at $p < 0.05$. **RESULTS:** Administration of GSNO resulted in S-nitrosation of SIRT1. This phenomenon was accompanied by increased global protein acetylation and reduction of pAMPK in the liver and gastrocnemius muscle. Interestingly, diet-induced obese mice and ob/ob mice showed a significant increase in the protein content of iNOS and S-nitrosylation of SIRT1 in liver and muscle. It was possible to observe the co-localization of iNOS and SIRT1 in liver and muscle samples from obese animals. On the other hand, iNOS^{-/-} animals presented lower levels of S-nitrosylation of SIRT1 in both the liver and gastrocnemius. These data were accompanied by a milder obesity phenotype. Approaches such as physical training was able to reverse/prevent S-nitrosylation of SIRT1 in obese mice while maintaining the content of SIRT1 and mitochondrial function accompanied by a reduction in acetylation in the tissues in question. **CONCLUSION:** SIRT1 deacetylase activity in obesity is at least partially related to the increase in iNOS levels favoring

the manifestation of the mechanism of S-nitrosation in hepatic tissue and skeletal muscle.

Key words: Sirtuin 1; muscle; liver; obesity; exercise.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AICAR	-----	Ribonucleótido 5-aminoimidazole-4-carboxamida
Akt	-----	Proteína quinase B
AMPK	-----	Proteína quinase ativada por AMP
AG	-----	Ácido graxo
DAG	-----	Diacylglicerol
DNA-PK	-----	Proteína quinase ativada por DNA
DT2	-----	Diabetes tipo 2
ERRα	-----	Receptores alfa relacionados a estrógeno
eNOS/NOS 3	-----	Óxido nítrico sintase endotelial
FOXO1	-----	Fator de transcrição FoxO1
GAPDH	-----	Proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT-4	-----	Transportador de glicose 4
GSH	-----	Glutathione
GSNO	-----	S-nitrosoglutathione
G6Pase	-----	Glicose 6 fosfatase
HDAC2	-----	Histona desacetilase-2
HE	-----	Hematoxilina-eosina
HIF	-----	Fator induzidos por hipóxia
HL	-----	Dieta rica em gordura (hiperlipídica)
IMTG	-----	Triacylglicerol intramuscular
TTI / ITT	-----	Teste de tolerância à insulina
iNOS / NOS2	-----	Óxido Nítrico Sintase Induzível

iNOS KO / iNOS^{-/-} ----- Nocaute para iNOS
IR ----- Receptor de insulina
IRS1 ----- Substrato do receptor de insulina 1
LIRKO ----- Nocaute do receptor da insulina (fígado)
LKB1 ----- Proteína quinase B1 do fígado
LPS ----- Lipopolissacarídeo
MTCO1 ----- Complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial
NFκB ----- Fator nuclear kappa B
nNOS/NOS 1 ----- Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO ----- Óxido nítrico
NRF1 ----- Fator de respiração nuclear 1
NRF2 ----- Fator de respiração nuclear 2
OAG ----- Oxidação de ácidos graxos
OBOB ----- Animais com mutação no gene responsável pela produção de leptina
OXPHOS ----- Cadeia de fosforilação oxidativa
PCB ----- Piruvato carboxilase
PEPCK ----- Fosfoenol piruvato carboxilase
PKC ----- Proteína quinase C
PGC1α ----- Coativador 1alfa de PPARγ
PPARs ----- receptor ativado por peroxissomas
TTP / PTT ----- Teste de tolerância a piruvato
RER ----- Quociente respiratório
SIRT's ----- Regulador de informação silenciosa
S-H ----- Grupamento tiol

S-NO ----- Grupamento nitroso tiol

TMB ----- Taxa metabólica basal

Uqcrc1-----Subunidade 1 do complexo citocromo b-c1

VCO₂----- Consumo de dióxido de carbono

VO₂-----Volume de O₂

Wild type (WT) -----Fenótipo da forma típica de uma espécie tal como ocorre na natureza (Camundongos selvagens).

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1. Via de ativação da proteína SIRT1. -----	22
Figura 2. Forma esquemática - As óxido nítrico sintases e a produção de óxido nítrico.-----	24
Tabela 1. Constituição da dieta hiperlipídica à base de gordura saturada -----	30

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	p.17
<i>Obesidade, resistência à insulina e disfunção mitocondrial</i>	<i>p.17</i>
<i>SIRT1 e função mitocondrial</i>	<i>p.21</i>
<i>S-nitrosação: um mecanismo de regulação pós-traducional</i>	<i>p.24</i>
<i>Exercício físico</i>	<i>p.26</i>
 OBJETIVOS	 p.28
<i>Objetivo geral (etapa1 e etapa 2)</i>	<i>p.28</i>
<i>Objetivos específicos (etapa1 e etapa 2)</i>	<i>p.28</i>
 MATERIAIS E MÉTODOS	 p.29
 RESULTADOS	 p.39
<i>Artigo 1</i>	<i>p.39</i>
<i>Artigo 2</i>	<i>p.65</i>
 DISCUSSÃO	 p.81
 CONCLUSÃO	 p.83
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 p.86
 ANEXOS	 p.99

1. INTRODUÇÃO

Os inúmeros estudos que abordam diferentes facetas epidemiológicas sobre obesidade (1-5), revelam-se cada vez mais preocupantes a cada ano. Partindo de uma prevalência global de 10% em 1960, a população dos Estados Unidos possui hoje mais de 30% de pessoas obesas (1, 2). Já no Brasil, dados coletados em 1975 mostraram que 7% das mulheres e 2,8% dos homens eram obesos (3). Duas décadas depois, tais prevalências chegaram respectivamente, a 12,5% e 7%, e a uma taxa global de 12% em 2000 (3). Ademais, projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam para prevalências maiores que 50% nos Estados Unidos e maiores que 25% no Brasil até o ano de 2025 (4). Dessa forma, considera-se que a obesidade é a principal responsável pelo estabelecimento de síndrome metabólica, e está associada a diversas doenças como cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2), câncer, hipertensão, dislipidemias, esteatose hepática não alcoólica e outras (4). Além disto, o aumento excessivo do peso corporal decorrente do acúmulo de tecido adiposo, constitui uma das mais importantes questões de saúde pública a ser investigada. Portanto, o desenvolvimento de diferentes abordagens para reduzir essa doença é um ponto de grande relevância na atualidade (4, 5).

A síndrome metabólica é definida por anormalidades que incluem, obesidade central, resistência à insulina, hiperlipidemia, hiperglicemia (6). Assim sendo, a produção excessiva de glicose pelo tecido hepático e sua diminuição na captação nos tecidos periféricos (músculo e tecido adiposo) culminam no estado de hiperglicemia, desequilíbrio que por consequência, conduz à resistência à insulina e as consequentes comorbidades fisiopatológicas.

Diversos estudos demonstraram a relação entre o metabolismo hepático e funcionalidade metabólica, enfatizando que a perda ou disfunção do tecido hepático, leva a quadros fisiopatológicos como os citados anteriormente. O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano, apresentando uma massa de aproximadamente 1,5 kg (7). Cerca de 80% de seu volume é composto por hepatócitos, e o restante do órgão é constituído de células não parenquimais, incluindo células endoteliais, células de Ito, células de Kupfer e linfócitos (8). Ele possui uma função central no controle do metabolismo intermediário, pois é responsável por aceitar e determinar o direcionamento das gorduras nele presentes, de acordo com as condições metabólicas e hormonais do indivíduo (9-11). O fígado é um órgão que exerce papel

primordial na produção de glicose, por intermédio da gliconeogênese a partir de compostos aglicanos (não-carboidratos), como lactato, glicerol e aminoácidos (alanina), especialmente durante o jejum prolongado (2). Nesse processo, a insulina é vista como um importante hormônio regulatório, para a supressão da síntese de novas moléculas de glicose. No período pós-prandial, por exemplo, os níveis séricos de insulina aumentam consideravelmente, diminuindo a gliconeogênese hepática pela inibição da transcrição dos genes relacionados a esse processo (3). Nesse sentido, Schwartz e Fisher, (12, 13) ao criar um modelo geneticamente modificado de camundongos nocautes do receptor de insulina no fígado - denominado de camundongos LIRKO (*liver-specific insulin receptor knockout*), demonstraram que a ausência desse receptor causa severa resistência à insulina, intolerância à glicose e incapacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose. À luz desses achados, Moura e colaboradores concluíram que prejuízos na propagação da sinalização molecular da insulina no fígado, em estado de obesidade, é capaz de aumentar a produção hepática de glicose e subsequentemente causar alteração de início na glicemia pós-prandial e tardiamente na glicemia de jejum. Portanto, o papel de moléculas capazes de regular positivamente a ação da insulina no tecido hepático, as quais podem posteriormente melhorar a homeostase da glicose, é de extrema importância na ciências da saúde e patologia clínica (14-23).

Além disso, a literatura enfatiza que a resposta à sinalização da insulina traz consigo diversos efeitos biológicos, tanto no músculo esquelético quanto no tecido hepático. No fígado, a fosforilação em serina do resíduo 256 da FOXO1 (*Forkhead box-containing gene, O subfamily*) leva a extrusão nuclear da FOXO1 e sua inativação (24, 25). A FOXO1 atua como fator de transcrição se ligando aos genes promotores da gliconeogênese como Piruvato Carboxilase (PCB) e Glicose 6 fosfatase (G6Pase), resultando assim em síntese de glicose nesse tecido.

Entende-se que o fator de transcrição FOXO1 seja responsável pelo aumento da transcrição de genes da proteína PGC1 α (coativador 1 α de PPAR γ), que codifica um importante amplificador para gliconeogênese hepática e a cessação na interação entre PGC1 α e FOXO1 pela insulina reduzindo a gliconeogênese hepática (25).

O PGC1 α têm sido retratado como um dos principais reguladores da homeostase energética no organismo (26). Estudos recentes a capacidade do PGC-

1 α em se ligar a diversos fatores de transcrição, ou receptores nucleares diretamente ligados especialmente à respiração mitocondrial, como no receptor dos fatores de respiração nuclear 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2, respectivamente), receptores α relacionados a estrógeno (ERR α do inglês) e receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs), ou ainda com outros fatores que controlam a disponibilidade de macro nutrientes, como ácidos graxos e carboidratos (27). Nesse sentido, um interessante estudo demonstrou que camundongos com supressão específica do PGC-1 α no tecido hepático, exibem um fenótipo de esteatose hepática. Isto foi atribuído, ao menos parcialmente, a perda da capacidade oxidativa e disfunção mitocondrial nas células do fígado. Além disso, a literatura já dispõe de dados demonstrando que a superexpressão de PGC-1 α hepática e seu subsequente aumento na oxidação de ácidos graxos (OAG), através do conteúdo e/ou função mitocondrial elevados, resulta no armazenamento reduzido de triglicerídeos, tanto em modelo '*in vivo*' quanto '*in vitro*' (28).

Nesse contexto, apesar do tecido hepático ser o principal órgão relacionado com a homeostase metabólica, o tecido muscular esquelético é o maior tecido do corpo humano, com aproximadamente 40% da massa corporal. Este tecido também desempenha papel primordial no metabolismo da glicose e dos ácidos graxos (14-23, 29-48), por meio da captação e a manutenção da homeostase metabólica. O músculo esquelético é um dos principais alvos da ação da insulina, sendo que, aproximadamente 70% da glicose ingerida é oxidada dentro das células musculares, com finalidade de obtenção de energia ou sendo armazenada sob a forma de glicogênio. Adicionalmente, o músculo é o maior tecido envolvido na oxidação dos lipídios para obtenção de energia. Durante um esforço físico, os músculos esqueléticos consomem aproximadamente 40% dos ácidos graxos livres em circulação; em repouso mais de 90% da energia despendida é obtida a partir da oxidação deste substrato. Sendo assim, a funcionalidade plena desse tecido é crucial para o metabolismo energético em mamíferos (29-31).

Em casos de obesidade, as funções metabólicas do músculo esquelético podem ser comprometidas, uma vez que homeostase energética é altamente regulada por processos que requerem um forte equilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético (32). O gasto energético inclui três componentes importantes e determinantes para a sua homeostase: taxa de metabolismo basal (TMB), a

atividade física e termogênese adaptativa. Estes, quando atuam de maneira desarmônica prejudicam a vitalidade do tecido muscular (33, 34).

Diferentes estudos têm demonstrado capacidade reduzida do músculo esquelético de indivíduos obesos e diabéticos para a oxidação dos ácidos graxos. Os estudos relatam que esse fenômeno está relacionado com a diminuição da atividade de diversas enzimas envolvidas no processo de oxidação lipídica, além do decréscimo na densidade e funcionalidade das mitocôndrias presentes no músculo esquelético, em casos de obesidade (20, 21, 42). Consequentemente, a reduzida capacidade oxidativa das células musculares contribuem marcadamente com o acúmulo anormal intramuscular de triacilglicerol (IMTG), resultando em um fenômeno conhecido como lipotoxicidade, e induzindo resistência à insulina através de mecanismos distintos, como a ativação de diferentes isoformas da proteína quinase C (PKC) (14-23).

Em células do tecido muscular esquelético, também há grande importância da PGC-1 α . Pois, similarmente ao seu papel nas células hepáticas, essa molécula possui também efeitos positivos sobre fatores de respiração nuclear (NRFs) e os genes mitocondriais promovendo sua ativação e expressão do transportador de glicose 4 (GLUT-4) contribuindo para o aumento da captação de glicose e maior sensibilidade à insulina (49). Adicionalmente o fator de transcrição FOXO1 foi considerado fator-chave da homeostase energética muscular através do controle do fluxo glicolítico e lipolítico e do metabolismo mitocondrial (50).

Evidências ainda apontam que disfunções mitocondriais observadas no músculo de indivíduos obesos são determinantes para o comprometimento do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos, levando à resistência à insulina (35). Dado o seu importante papel no metabolismo celular, as mitocôndrias têm sido consideradas sensores de toxicidade e função de muitos tecidos e órgãos, incluindo o fígado. Efeitos na função mitocondrial (30, 36-41), desestruturação na morfologia mitocondrial (30, 35), menor expressão dos genes responsáveis pelo metabolismo oxidativo (42, 48, 51, 52, 118) e acúmulo de lipídeos intramiocelular, têm sido propostos como mecanismos que medeiam o processo da doença. Não obstante, diversos estudos têm mostrado uma associação inversa entre o tecido muscular, tecido hepático e sensibilidade à insulina, em indivíduos obesos (44, 45, 53) e diabéticos do tipo 2 (46-48). Nesse sentido, acredita-se que os ácidos graxos

intracelulares, tais como o diacilglicerol (DAG) e as / ou ceramidas, possivelmente produzida devido ao metabolismo mitocondrial, possam interferir negativamente na sinalização de insulina (14-17). Esses achados nos conduzem a uma perspectiva de que a redução do conteúdo e / ou capacidade oxidativa mitocondrial contribui para a resistência à insulina (18, 19, 41).

SIRT1 e função mitocondrial

As sirtuínas formam uma classe de proteínas com atividade desacetilase. A família das SIRTs (*silent mating type information regulator 2 homolog*) é composta por 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); e mitocôndrias (SIRT3,4 e 5) (54). A SIRT1 foi originalmente descrita como uma molécula com diversas funções biológicas, entre elas; controle da inflamação, silenciamento gênico, apoptose, metabolismo celular e reparo de DNA (55).

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 coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 α) (56, 57). A desacetilação do PGC1 α promovida pela SIRT1 é essencial para que ocorra a co-ativação dos fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e NRF-2), que induzem a transcrição de genes envolvidos na biogênese mitocondrial (58, 59).

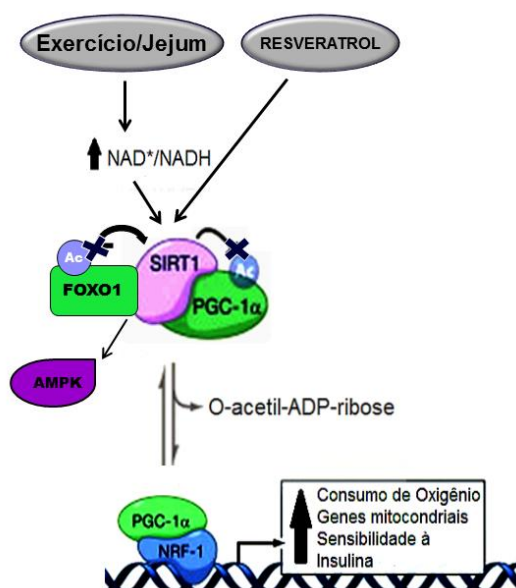


Figure 1. A ativação da SIRT1 aumenta a sua atividade desacetilase promovendo a deacetilação da FOXO1 e PGC1α, biogênese mitocondrial e do metabolismo oxidativo em diversos tecidos, como fígado e músculo esquelético [35]. Concomitantemente promove ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) regulando o controle do gasto energético e assim sendo um interessante alvo terapêutico para o controle da saúde e prevenção de disfunções metabólicas e doenças (60).

Especificamente no fígado, evidências mostraram que a atividade SIRT1 desempenha um papel crítico no controle do metabolismo lipídico (61). Ao mesmo tempo, demonstraram que a atividade de SIRT1 pode atenuar a doença hepática gordurosa não alcoólica para reduzir a expressão de genes envolvidos na síntese de gordura, contribuindo para uma melhora da sensibilidade à insulina no fígado (62).

De maneira interessante, a expressão proteica e a atividade desacetilase da SIRT1 no músculo esquelético de camundongos obesos e idosos mostrou-se significativamente reduzida (63, 64), assim como recentes estudos confirmaram que a SIRT1 reduz níveis de TG hepática inibindo a lipogênese além de estimular a beta oxidação de ácido graxo (65-67). Por outro lado, postula-se que a restrição calórica, o exercício físico e um polifenol conhecido como Resveratrol são capazes de aumentar a atividade desacetilase da SIRT1, ativar a PGC1α e consequentemente a biossíntese mitocondrial (63, 68, 69), uma vez que os níveis de NAD^+ nos tecidos de mamíferos são aumentados em condições de estresse metabólico, acionando a

quinase ativada por AMP (AMPK) o qual é outro grande sensor energético acondicionado assim à homeostase metabólica / energética corporal (70). A ativação da SIRT1 leva à desacetilação da proteína quinase B1 do fígado (LKB1) que fosforila AMPK (71). Além disso a AMPK aumenta a atividade SIRT1 e os níveis intracelulares de NAD^+ (72-74), demonstraram ser dessa forma o papel crucial da via SIRT1 / AMPK / PGC-1 α no controle do metabolismo energético (75-78). Agentes farmacológicos ativadores da AMPK (como o AICAR) demonstraram aumentar os níveis de NAD^+ e ativar a atividade de SIRT1 (68). Assim diversos estudos apontam que a SIRT1 pode detectar mudanças nos níveis celulares de NAD^+ e isso reflete nos níveis de energia intracelular ajustando as saídas de energia por desacetilação da proteína, o que modula níveis e atividades de reguladores metabólicos e geralmente altera a transcrição nas vias metabólicas.

Recentemente, nosso grupo de estudo demonstrou que o exercício físico foi capaz de aumentar a expressão da SIRT1 no músculo esquelético de ratos idosos, contribuindo com a melhora da sensibilidade à insulina (64). Interessantemente, Pauli e colaboradores descreveram que agudamente o exercício físico foi capaz de reduzir significativamente a interação FOXO1/PGC1 α no fígado de ratos obesos, ambos reguladores de transcrição de genes envolvidos na resposta ao estresse celular (82). Em adição, estudos apontam 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 (83-85), câncer (86, 87) e neurodegeneração (88, 89). 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 e fígado (54, 56-59, 63, 64, 68, 69, 76, 83-92).

Embora nos últimos anos, muitos estudos tenham revelado estratégias promissoras para aumentar a atividade de acetilase da SIRT1 em modelos experimentais de obesidade e envelhecimento, pouco se sabe quais os reais mecanismos que estão relacionados com a redução da sua atividade e/ou da sua expressão proteica no tecido hepático e em músculo esquelético de mamíferos.

S-nitrosação: um mecanismo de regulação pós-traducional.

Nos últimos 10 anos demonstrou-se que além de suas ações vasodilatadoras, o óxido nítrico (NO) tem também papel fundamental como sinalizador intracelular, controlando várias funções da célula (93-113). 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 (93, 94). 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 (93).

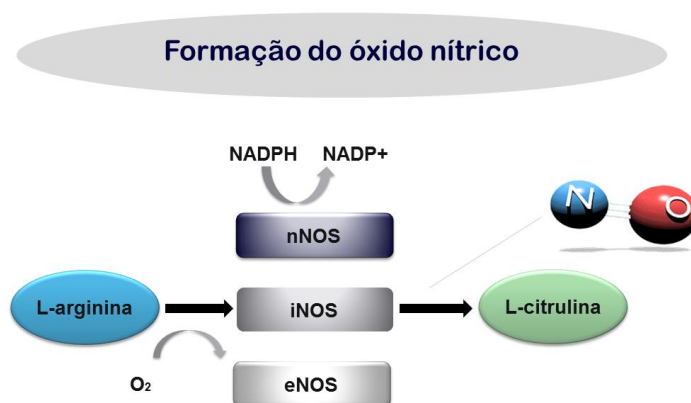


Figura 2. Forma esquemática - As óxido nítrico sintases e a produção de óxido nítrico. As diferentes isoformas de óxido nítrico sintases catalisam a produção de óxido nítrico e L-citrulina a partir de L-arginina, oxigênio e de NADPH.

A S-nitrosação ou S-nitrosilação ocorre pela ligação covalente do NO com um grupamento tiol (S-H) presente em resíduos de cisteína, formando um S-nitrosotiol (S-NO) (95). Acredita-se que uma reação direta do radical NO com o grupamento tiol não leva a formação de um nitrosotiol (96). Para tanto, é necessária a oxidação do NO, após a reação com O_2 , e formação de N_2O_3 (97, 98). Esta reação acontece

provavelmente com mais facilidade no ambiente hidrófobo da membrana celular (99), ou em microambientes hidrófobos dentro da própria estrutura protéica (100), 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 (101-103). Este segundo mecanismo de S-nitrosação tem importância biológica devido à alta concentração celular de tióis de massa molecular pequena, como a glutathiona, 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 aconteceu(104). Existem ainda outros modelos bioquímicos identificados *in vitro* para explicar a formação de nitrosotióis, como os obtidos a partir da doação de NO por nitrito (95), ou catalizada até mesmo por metaloproteínas (105). Várias proteínas podem ter sua função modificada por S-nitrosação, como por exemplo, p21ras (106), NFκB (107), a família HIF (fator induzido por hipóxia) (108), metaloproteinases matriciais (109), e outros.

A S-nitrosação vem sendo valorizada como uma das principais formas de modificação protéica induzida pelo NO, devido a sua alta reatividade, por ocorrer em condições fisiológicas, e devido à grande quantidade de processos celulares regulados por S-nitrosação (105, 110, 111). 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 (110-112). Em dois desses estudos, demonstramos que o aumento da expressão da iNOS observada em roedores obesos induzidos por dieta rica em gordura, estava relacionada ao aumento da S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1 e Akt levando a resistência à insulina (110, 111). De maneira interessante, camundongos nocaute para a iNOS (iNOS^{-/-}), não apresentaram a S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1 e Akt no músculo esquelético e ficaram protegidos de desenvolver resistência à insulina mesmo quando expostos à dieta rica em gordura (111). Resultados similares foram encontrados nos camundongos velhos (135), assim também recentemente demonstrado por Katashima e colaboradores (114) que a obesidade promoveu a S-

nitrosação das proteínas da via da insulina, enquanto a inibição de iNOS restaurou a sinalização de insulina hipotalâmica.

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 (113). Adicionalmente, os autores observaram que a S-nitrosação da SIRT1 promoveu aumento substancial da acetilação da PGC1 α (113).

Recentemente, dois grupos independentes demonstraram que a ligação covalente de óxido nítrico (NO) na cadeia lateral do tiol nos resíduos de cisteína do SIRT1 reduziu a atividade da deacetilase *in vitro* (113) e *in vivo* (115), através do mecanismo pós-tradução dependente de GAPDH e iNOS, chamado S-nitrosilação / S-nitrosação. Em modelos animais de inflamação sistêmica, incluindo doença de Parkinson ou atrofia muscular relacionada ao envelhecimento, iNOS leva à S-nitrosilação SIRT1, reduzindo a capacidade de desacetilação (115). Coletivamente, esses dados sugerem que a atividade desacetilase da SIRT1 pode ser negativamente modulada através do mecanismo de S-nitrosação (76, 90, 93-113).

Exercício Físico

Uma alternativa para minimizar ou prevenir os efeitos ocasionados pela síndrome metabólica advinda da obesidade é o exercício físico. Já é bem elucidado que prática regular de exercícios físicos traz consigo diversos benefícios como melhora da sensibilidade à insulina, por agir sobre as interações moleculares de forma aguda ou cronicamente, tanto em animais quanto em humanos obesos (116-119).

Já é consenso na literatura que a prática regular de atividade física representa uma estratégia terapêutica não-farmacológica mais eficaz para a prevenção e tratamento à resistência a insulina, obesidade e doenças associadas.

Estudos apontam que o exercício físico demonstrou ser muito eficaz tanto para a prevenção quanto para o manejo de muitas doenças, especialmente a síndrome metabólica (120). Indivíduos obesos têm como características comuns o problema na sinalização de insulina devido ao processo inflamatório sub-clínico. Este processo mostra uma diminuição da ação desse hormônio em células-alvo e é influenciado pela presença de hiperglicemia de jejum e hiperinsulinemia, alterações essas associadas a uma diminuição da absorção de glicose pelo músculo esquelético em resposta à insulina (121). De forma semelhante, Pauli e colaboradores, demonstram que o fígado exerce papel chave no metabolismo da glicose, sendo a insulina o hormônio chave também no processo de gliconeogênese. Ropelle (122) e colaboradores demonstraram ao submeter ratos alimentados com dieta rica em gordura ao protocolo de exercício agudo, à melhora da glicemia de jejum em ratos com resistência à insulina através de uma redução na associação de FOXO1 com PGC-1 α , que controla PEPCCK e G6Pase no fígado. Dessa forma, a explicação pelo qual o exercício aumenta a captação de glicose e reduz a hiperglicemia mediada pela insulina pode ser parcialmente entendido pelo aumento da expressão e atividade de proteínas chaves na regulação do metabolismo da glicose tanto no fígado quanto no músculo esquelético (123-125).

Pauli e colaboradores demonstraram que o treinamento físico ativa a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), e a AMPK na forma fosforilada ativa vias que geram o aumento de ATP, tais como a oxidação de ácidos graxos, ao mesmo tempo em que inibe as vias anabólicas que consomem e degradam os estoques de ATP, tal como a síntese de ácidos graxos (AG), promovendo então uma ativação “*downstream*” da via de sinalização da SIRT1/PGC-1 α (112). O PGC-1 α influencia a regulação do transporte de glicose e biogênese mitocondrial (63, 127). Um extenso acumulado de evidências demonstraram que animais submetidos ao treinamento físico obtiveram melhoras na biogênese mitocondrial, bem como no aumento dos níveis de NAD⁺ nos órgãos metabólicos primários (72, 128, 129). Acredita-se que muitos dos benefícios do exercício e do jejum sejam efeitos do aumento do NAD⁺, que estimula a função mitocondrial, culminando na oxidação de gorduras e aumento nas reservas de glicogênio (75). No entanto o contrário foi comprovado por administração crônica de dieta rica em gordura ao reduzir os níveis de PGC-1 α

hepático em camundongos tipo selvagem sedentários, resultando em redução da respiração mitocondrial hepática (130).

Paralelamente a S-nitrosação de proteínas é uma característica da inflamação também relacionada à obesidade e está causalmente ligada à óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (131, 132). O processo reverso de S-nitrosilação é chamado de desnitrosilação, que pode ocorrer espontaneamente na presença da forma reduzida de glutathione (GSH) (133). Além disso, Radak e colaboradores, demonstraram que o exercício regular aumenta o conteúdo intracelular de GSH e diminui a inflamação crônica de baixo nível no fígado em ratos idosos (134). Portanto, a desnitrosilação é facilitada quando o conteúdo intracelular de glutathione (GSH) é aumentado. Sendo assim, o exercício demonstrou reverter, pelo menos em parte, a S-nitrosação e manter a sensibilidade à insulina no músculo de animais obesos (110, 135).

Mediante o exposto, aventamos a hipótese de que em situações de obesidade, a S-nitrosação da SIRT1 esteja relacionado com a menor atividade dessa enzima em tecidos como músculo e fígado, contribuindo para o quadro de resistência à insulina e disfunção mitocondrial.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Etapa1. Avaliar a S-nitrosação da SIRT1 em tecido hepático e muscular de roedores obesos.

Etapa 2. Verificar os efeitos do exercício físico sobre a S-nitrosação da SIRT1.

Objetivos específicos

Etapa1.

- Avaliar o efeito da administração de GSNO sobre a S-nitrosação da SIRT1, acetilação, fosforilação da AMPK e sobre a sensibilidade à insulina no fígado e músculo esquelético de camundongos.
- Verificar a S-nitrosação da SIRT1 e acetilação, marcadores mitocondriais, sensibilidade à insulina no fígado e músculo esquelético de camundongos tratados com dieta hiperlipídica.
- Analisar a S-nitrosação da SIRT1, acetilação, marcadores mitocondriais e a sensibilidade à insulina no fígado e músculo esquelético de camundongos *ob/ob*.
- Averiguar a S-nitrosação da SIRT1, acetilação, a marcadores mitocondriais e a sensibilidade à insulina no fígado e músculo esquelético em camundongos iNOS KO (iNOS^{-/-}) alimentados com dieta hiperlipídica.

Etapas 2.

- Avaliar o efeito do treinamento de oito semanas de exercício físico sobre a S-nitrosação da SIRT1, acetilação, marcadores mitocondriais e sobre a sensibilidade à insulina no fígado e músculo esquelético em camundongos obesos.

3. MÉTODOS

Animais e dietas

Para o desenvolvimento do projeto, foram utilizados camundongos (*mus musculus*) machos, da linhagem C57BL/6J, camundongos isogênico/B6.V-Lepob/JUnib (*ob/ob*) e camundongos *knockout* para iNOS, iNOS-null (iNOS^{-/-}) advindos da Jackson Laboratory (C57BL/6-Nos2tm1Lau colony), conforme aprovação no comitê de ética CEUA/UNICAMP: 4251-1 provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Todos os animais foram alocados em gaiolas individuais e mantidos em um ciclo claro e escuro de 12:12 horas, alojados em gaiolas entre 22-24°C. O ciclo claro começou às 6:00 da manhã. Os animais tiveram acesso livre água e dieta *ad libitum* (ração padrão para roedores (3948 Kcal/Kg) ou

dieta hiperlipídica à base de gordura saturada (5358 Kcal/Kg) *ad libitum* durante 8 semanas, 15 dias que antecederam os experimentos foi adicionado sacarose 10% a água dos animais (136) (Sucrose BIO-RAD RNase free) de forma a seguir as diretrizes da Universidade Estadual de Campinas e do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) para o uso de animais em estudos experimentais conformes ao Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (publicação NIH nº 85-23 revisado em 1996).

Tabela 1.

Ingredientes	Ração padrão (g/Kg)	Kcal/Kg	DHL (g/Kg)	Kcal/Kg
Amido de milho	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Açúcar	100	400	100	400
Amido dextrinizado	132	528	132	528
Gordura saturada	-	-	312	2808
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mistura de minerais	35	-	35	-
Mistura de vitaminas	10	-	10	-
L-cystina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

Reagentes e anticorpos

Os reagentes e os aparelhos para o gel eletroforese de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina e ditioneitol (DTT) foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO). Insulina recombinante humana (Humulin®) fabricada pela *Elli Lilly Co.* (Indianapolis, IN). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2µm) foi de *Schleicher & Schuell*. Os anticorpos anti-Acetyl Lysine (mouse monoclonal SC81623) anti-PGC1α (rabbit polyclonal, SC13067), anti-

iNOS (mouse monoclonal SC7271), anti-Uqcrc1 (goat polyclonal SC69060), foram importados da *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA), anti-pAMPK α 1/2 (rabbit polyclonal, SC33524), anti-AMPK α 1/2 (rabbit polyclonal, SC25792), anti-G6Pase- β (mouse polyclonal SC134714), anti-PCB (mouse monoclonal SC271493), anti-AlphaTubulin (polyclonal rabbit #2144), anti-FOXO1 (rabbit monoclonal, #C29H4). Anticorpos anti-SIRT1 (rabbit #2028S), anti-SIRT1 (rabbit policlonal SC7271) foram importados respsectivamente da empresa Santa Cruz e Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA), OXPHOS Roedent WB antibody cocktaill (AB 110413) e anti-MTCO1 (mouse monoclonal, Ab14795) foi importado da empresa Abcam Biotechnology (Charlottesville, VA, USA).

Consumo de oxigênio e atividade locomotora

O consumo de oxigênio (VO_2) e a produção de dióxido de carbono (VCO_2) foram determinados através de um sistema de calorimetria de circuito aberto controlado por computador LE405 Gas Analyzer (Panlab - Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA). Os animais foram alojados individualmente em câmaras respiratórias claras e o ar ambiente foi passado através de câmaras a um caudal de 10 vezes o respectivo peso de cada animal. O fluxo de ar dentro de cada câmara foi monitorado por um sensor Air Supply & Switching (Panlab - Harvard Apparatus). Os sensores de gás foram calibrados antes do início de experimentos com padrões de gás primário contendo concentrações conhecidas de O_2 , CO_2 e N_2 (Air Liquid, São Paulo, Brasil). As análises foram realizadas em triplicado de 6 min para cada câmara. Portanto, cada animal foi avaliado durante 24 horas. Os valores de referência do ar ao ar livre foram amostrados após cada quatro medidas. As amostras de ar foram sucessivamente passada através de sensores de O_2 e CO_2 para determinar o teor de O_2 e CO_2 , a partir do qual as medidas de consumo de oxigênio (VO_2) e produção de dióxido de carbono (VCO_2) foram estimadas. O VO_2 e o VCO_2 foram calculados pelo software Metabolism® 2.2v e expressos em $mL \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$, com base na equação de Withers. A atividade locomotora espontânea foi avaliada ao longo de um período de 24h usando um sistema de detecção controlado por computador da Panlab - Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA.

Análise Histopatológica

Os tecidos foram imersos *overnight* em paraformaldeído (4%) para fixação. Em seguida, foi feita a desidratação do material com diferentes concentrações de etanol (70%, 80% 95% e 100%, xilol e emblocado em parafina). Os tecidos (fígado e gastrocnêmio) foi cortado em micrótomo e fixado em lâminas de microscopia. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

Para análise da dupla marcação de SIRT1 e iNOS, foi utilizada a técnica de imunofluorescência. Para isso foi feita a desparafinização e hidratação das lâminas. A recuperação antigênica do tecido foi realizada em forno microondas doméstico a 700W e foi distribuído nas lâminas imersas em um tampão de citrato a 0,01 mol/l e pH igual a 6, 9 minutos, com intervalo de 2 minutos entre as imersões. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente para resfriarem. Em seguida, foi realizado o bloqueio com a peroxidase endógena (1% H₂O₂ em metanol) por 15 minutos. Após o bloqueio com BSA 3% por 1h, o material foi incubado *overnight*, a 4 °C com o anticorpo monoclonal de origem murina para SIRT1 e iNOS. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários, *mouse* para INOS e *rabbit* para SIRT1, para imunofluorescência (1:200), e mantidas no escuro por 1h. Após a incubação, as lâminas foram incubadas com DAPI 1:1200. Após a incubação, as lâminas foram montadas com glicerol e fotografadas no programa *axio vision* do microscópio Scope A1 da Zeiss com objetivas de 40x.

Teste de tolerância à insulina (TTI)

Antes do teste, todos os animais estavam em jejum durante 6h. Realizamos então um teste de tolerância à insulina (TTI, 1,5 U/kg de peso corporal de insulina). Em resumo, 1,5 UI / kg de insulina recombinante humana (Humulin R) de Eli Lilly (Indianapolis, IN) foram injetados intraperitonealmente (ip) e as amostras de sangue foram coletadas aos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, a partir da cauda para a determinação da glicose no sangue usando um medidor de glicose (Advantage, Boehringer Mannheim, Alemanha). A constante de taxa para o desaparecimento da glicemia (KITT) foi calculada usando a fórmula $0.693 / \text{semi-vida biológica} (t_1 / 2)$. A glicemia $t_1 / 2$ foi calculada a partir da inclinação da última análise quadrada da concentração plasmática de glicose durante a fase linear de declínio (137).

Teste de tolerância ao piruvato (TTP)

O teste de tolerância ao piruvato (TTP) foi realizado para estimar a gluconeogênese, de acordo com as seguintes etapas. Os animais foram submetidos a jejum durante 8h, usando um glucômetro (Advantage, Boehringer Mannheim, EUA). Uma primeira amostra de glicose foi coletada através da cauda. Após 5 minutos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de piruvato (2g / kg) dissolvido em solução de NaCl a 0,9% (Sigma®-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os níveis de glicose foram medidos após 30, 60 e 120 minutos e dados plotados em um gráfico.

Injeção de GSNO

S-nitrosoglutationa (GSNO) foi preparada pela reação de glutathione com nitrito de sódio em solução ácida, o tratamento foi realizado com injeção a 0,5 mol/l de GSNO via intraperitoneal de no tempo 5 minutos antes da extração dos tecidos. Utilizamos glutathione (GSH) para veículo.

Extração e preparo dos tecidos

Os camundongos foram anestesiados com uma solução de xilazina-cetamina (16 e 150 mg/kg de peso corporal respectivamente) para controle de anestesia observamos os reflexos pedal e de córnea antes de qualquer procedimento experimental. Posteriormente amostras do fígado e músculo gastrocnêmio foram extraídos e homogeneizadas em tampão contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de ortovanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado de cada amostra foi então centrifugado à 11.000 RPM por 40 minutos. Na porção sobrenadante da amostra, foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Biureto. Em seguida, o tampão de Laemmli (138) foi acrescido a cada uma das amostras que posteriormente foram ou não fervidas por 5 minutos e armazenadas à - 80°C para futura análise por *Western blot*.

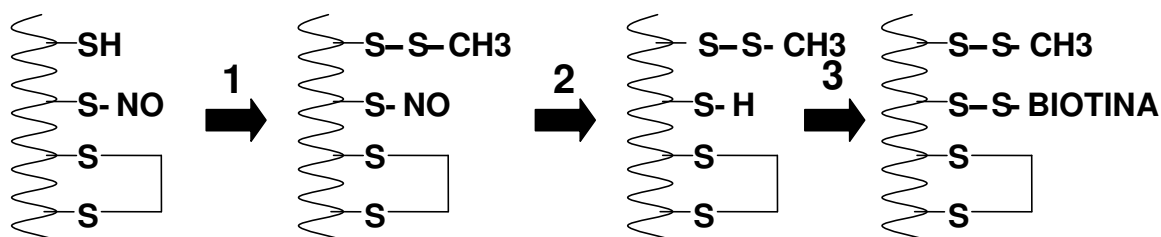
Análise protéica por immunoblotting.

As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (138) contendo Dithiothreitol (DTT) à 100mM. A seguir foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Tiveram como padrão um

marcador de peso molecular com valores estabelecidos em miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da Bio-Rad por 1 hora e 30 minutos a 120 volts, como descrito por Towbin et al. (139). Porém, no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) a 4°C *overnight*. Estas membranas foram então incubadas com 2 μ l de anticorpo secundário e posteriormente incubadas com solução de quimioluminescência (Pierce, CA). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente foi detectada e visualizada através do aparelho Syngene G:Box DR4V2/3154). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa Uniscan. O número de animais usados em cada experimento foi descrito nas legendas das figuras.

Biotinilação de Nitrosotiois

Este método para detecção de nitrosotiois foi publicado por Jaffrey e colaboradores (140), e identifica os compostos S-nitrosados numa sequência de reações que descreveremos a seguir. Na primeira etapa do método as cisteínas livres, não S-nitrosadas, foram bloqueadas através da metilação com MMTS (metil-metano-tiosulfonato). A seguir, as cisteínas hipoteticamente S-nitrosadas formam reduzidas a sua forma livre, a partir da adição e incubação com ácido ascórbico. No próximo passo, as cisteínas recém liberadas foram submetidas à incubação com HPDP-biotina, formando compostos do tipo-S-S-BIOTINA. Então as amostras foram incubadas com estreptavidina-AGAROSE, ou neutravidina-AGAROSE, que têm afinidade pela biotina, e posteriormente centrifugadas e lavadas. O pellet que possuiu somente proteínas originalmente S-nitrosadas na amostra inicial, foi então incubado com tampão para separação em gel de poliacrilamida. Após a separação, foi realizada transferência para membrana de nitrocelulose, e immunoblotting com anticorpo contra a proteína a ser investigada. Podemos visualizar o método de forma esquemática.



1 – Metilação- MMTS

2 – Redução das cisteínas S-nitrosadas

3 - Biotinilação

O método de biotinilação:

Extração Tecidual

- Extração e homogeneização tecidual utilizando-se o tampão 1 em temperatura de 4°C, com as amostras protegidas da luz. Concentração de aproximadamente 1g de tecido para 16 ml de tampão.
- Centrifugação a 2000g por 10 minutos a 4°C.
- Separação do sobrenadante.
- Dosagem da concentração protéica.
- Acrescentar CHAPS 10%, para concentração final de 0,4% na amostra.
- Separar alíquotas com a mesma quantidade de proteína, para um volume máximo de 100µl.

Bloqueio das Cisteínas livres (S-H)

- Acrescentar 300 µl da solução bloqueadora em cada tubo. Homogeneização e incubação a 50°C por 30 minutos, protegido da luz, em agitação contínua, ou freqüente.
- Ao final da incubação, acrescentar 800µl de acetona a –20°C em cada tubo. Deixar incubando a –20°C por 10 minutos.
- Centrifugar por 10 minutos a 2000g e 4°C. Ressuspender o pellet com mais 800µl de acetona a –20°C, centrifugar novamente com mesmos parâmetros e separar o pellet.

Biotinilação dos nitrosotiois

- Acrescentar 60µl do tampão 2 para ressuspender o pellet.
- Acrescentar 2µl de uma solução de ácido ascórbico 50mM. Agitar vigorosamente.
- Acrescentar 20µl de uma solução 4mM de HPDP-Biotina por tubo. Agitar a mistura e deixar reagir em temperatura ambiente por 1h. Não precisa mais proteger da luz.
- Após a incubação, acrescentar 200µl de acetona a -20°C e incubar por 20 minutos a -20°C para remover a HPDP-biotina.
- Centrifugar as amostras por 10 minutos, 2000g a 4°C. Ressuspender com mais 200µl de acetona a -20°C. Nova centrifugação com mesmos parâmetros e separação do pellet.

Separação das proteínas biotiniladas

- Ressuspender o pellet com 60µl do tampão 2 (0,1 ml por mg de proteína na amostra inicial)
- Acrescentar 120µl do tampão 3.
- Acrescentar 25µl de estreptavidina-agarose ou neutravidina-agarose para purificar as proteínas biotiniladas.
- Incubação por 1h em temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 200g.
- Lavar o pellet 5 vezes com 500µl do tampão 4. Centrifugar a 200g por 5 segundos em temperatura ambiente entre cada lavada.

Preparação das amostras para eletroforese

- Incubar o pellet com 30µl do tampão 5
- Acrescentar 10µl do tampão de Laemili por amostra.
- Ferver por 5 minutos, centrifugar e separar o sobrenadante para separação por eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito previamente.

O anticorpo utilizado foi anti-SIRT1 RABBIT #2028S importado da empresa Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA).

TAMPÃO 1

- Hepes.NaOH pH 7,7 25 mM
- EDTA 1 mM
- Neocuproina 0,1 mM

TAMPÃO 2

- Tampão 1
- SDS 1%

TAMPÃO 3

- Hepes.NaOH pH 7,7 20 mM
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM
- Triton x-100 0,5%

TAMPÃO 4

- Tampão 3
- NaCl 600 mM

TAMPÃO 5

- Hepes.NaOH pH 7,7 20 mM
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM
- 2-mercaptoetanol 100 mM

SOLUÇÃO BLOQUEADORA

- Tampão 1
- SDS 2,5%
- MMTS 20 mM

Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. Os resultados das quantificações de conteúdo e atividade proteica determinados por “*Western blot*” foram apresentados como comparações diretas das bandas protéicas, quantificadas por densitometria de imagem usando o programa *Uniscan*. Todos os dados foram

analisados através de teste “t de Student”, quando comparados dois grupos. A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$. O programa *STATISTIC 6.0* foi empregado para efetuar as análises.

4. RESULTADOS

(artigo1)

***EFFECT OF OBESITY ON SIRT1 S-NITROSYLATION IN HEPATIC TISSUE
AND SKELETAL MUSCLE OF MICE.***

Luciene Lenhare^{1,2}, Barbara M. Crisol¹, José Diego Botezelli¹, Vagner R. R. Silva¹, Carlos K. Katashima², André Victor Cordeiro¹, Juliana A. Camargo², Mario J. Saad², Adelino S. R. da Silva³, Dennys E. Cintra⁴, Leandro P de Moura^{1,4}, José R. Pauli^{1,5}, Eduardo R. Ropelle^{1,2,5}.

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.
3. Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.
4. Laboratory of Nutritional Genomics (LabGeN), School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, SP, Brazil.
- 5- CEPECE - Center of Research in Sport Sciences. School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, 13484-350, Brazil.

Running head: INOS induces SIRT1 S-nytrosylation.

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, a 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 inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) on SIRT1 S-nitrosylation in liver and skeletal muscle of obese mice. We identified high iNOS protein activity in hepatic tissue and skeletal muscle of obese mice. The data were also confirmed in *ob/ob* mice and it was accompanied by the augment of SIRT1 S-nitrosylation, PGC1 α and FOXO1 acetylation and impairment of mitochondrial biogenesis. We demonstrated that nitric oxide donor (GSNO) administration induced SIRT1 S-nitrosylation and reduced its deacetylase activity. Interestingly, iNOS knockout mice exhibited low levels of SIRT1 S-nitrosylation in obesity model, when compared to wild type mice. Collectively, our study provides substantial evidence that iNOS induces the SIRT1 S-nitrosylation and it is associated with the impairment of mitochondrial function in the liver and skeletal muscle of obese mice.

Keywords: Sirtuin1; muscle; liver; obesity; s-nitrosylation

INTRODUCTION

Sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2 homolog), the mammalian ortholog of yeast Sir2, is a highly conserved NAD⁺ dependent protein deacetylase and its activation implicates the prevention of important obesity-related metabolic disorder such as, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, some types of cancer (1), and fatty liver accumulation (2-17). These fatty acids excess overload with lipid other metabolic tissues such as, skeletal muscle and pancreatic β -cells, resulting in atherogenic dyslipidemia, insulin resistance, and hyperinsulinemia (18).

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 (19-23). SIRT1 can also be activated through an allosteric mechanism, whereas single amino acid Glu²³⁰, is critical for its in response to diverse sirtuin-activating compounds (24). Additionally, the mutational analysis of SIRT1 revealed that some cysteine residues in the catalytic domain are essential for their function (16, 24).

Accumulating evidences have shown that SIRT1 mediates its biological effects in several metabolic tissues by inducing AMPK (AMP-activated protein kinase) phosphorylation (2) and the deacetylation of PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), FOXO1 (3, 4) (Forkhead box protein O1) and p53 (5) (Tumor protein p53). Specifically, in liver, SIRT1 activity plays a critical role in the control of lipid metabolism (14). At the same time, evidences points the SIRT1 activity can attenuate non-*alcoholic fatty liver disease* by reducing genes expression involved in the synthesis of fatty acids, contributing to an improvement in insulin sensitivity in the liver (15). Whereas in the skeletal muscle, SIRT1 activity plays a critical role in the control of mitochondrial function and glucose metabolism, thus SIRT1 activation induces mitochondrial biogenesis and protects against high-fat diet induced-insulin resistance (12, 25-27).

Interestingly, the activity of AMPK appears to be cross-linked to SIRT1. Accumulating evidences have show that SIRT1 mediates its biological effects inducing AMPK phosphorylation (3) in skeletal muscle and SIRT1 activation leads to liver kinase B1 protein (LKB1) deacetylation which phosphorylates AMPK (7). AMPK, in turn, also increases SIRT1 activity by increasing the intracellular NAD⁺ levels (3, 8,

9). Consistent with this notion, several studies demonstrated the crucial role of SIRT1/AMPK/PGC-1 α pathway in the control of the metabolism (10-13). Similarly, in skeletal muscle C2C12 cells, SIRT1 activity is enhanced by AMP-activated protein kinase (AMPK) and increasing cellular NAD⁺ levels (3, 28). SIRT1 (43-44) in C2C12 cells also appears to be under control of adiponectin through Ca²⁺ signaling and changes of the NAD⁺/NADH ratio (13).

Recently, two independent groups demonstrated that the covalent attachment of Nitric Oxide (NO) in the thiol side chain in the cysteine residues (Cys³⁸⁷ and Cys³⁹⁰) of SIRT1 reduces its deacetylase activity *in vitro* (16) and *in vivo* (17), through the post translational mechanism dependent on GAPDH and iNOS, called S-nitrosylation. In animal models of systemic inflammation including, Parkinson's disease or aging-related muscular atrophy, iNOS leads SIRT1 S-nitrosylation, reducing its deacetylation capacity (17).

The S-nitrosylation of proteins is an essential mechanism for dynamic, post-translational modification of intracellular proteins in eukaryotic cells. S-nitrosylation 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 function (29). In this context, the inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) has a powerful impact on S-nitrosylation induction, because it serves as main intracellular NO source, in particular under inflammatory circumstances (30-32). The augment of iNOS expression and S-nitrosylation were recently associated with insulin resistance in the skeletal muscle of obese (33) and aged rodents (34). Interestingly, the absence of iNOS leads to the increase of energy expenditure, mitochondrial biogenesis and insulin sensitivity in different models of obesity (23, 35, 36).

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

METHODS

Animals

Male mice C57BL6 / J, isogenic mice / B6.V-Lepob / JUnib (ob/ob) and knockout mice for iNOS, iNOS-null (iNOS^{-/-}) from Jackson Laboratory (C57BL / 6-Nos2tm1Lau colony), was approved by the committee of ethics CEUA / UNICAMP:

4251-1 from the Bioethics Center of UNICAMP (CEMIB). All animals were maintained in individual cages in a light and dark cycle of 12:12, 22-24 ° C. The light cycle began at 6:00 in the morning. The animals had free water access ad libitum diet (standard ration for rodents (3948 Kcal / kg) or saturated fat (5358 Kcal / kg) adipitum hyperlipid diet for 8 weeks, 15 days prior to the experiments sucrose 10% (37) for the use of animals in experimental studies and experiments in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23 revised in 1996)

Reagents and Antibodies

The reagents and apparatus for the eletroforesi gel of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) were from Bio-Rad (Richmond, CA). Methane hydroxymethylamine (TRIS), phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), aprotinin and dithiothreitol (DTT) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Recombinant human insulin (Humulin®) manufactured Elli by Lilly Co. (Indianapolis, IN). The nitrocellulose membrane (BA85, 0,2.m) was used Schleicher & Schuell. The anti-Acetyl Lysine (mouse monoclonal SC81623) anti-PGC1 α (rabbit polyclonal, SC13067), anti-iNOS (mouse monoclonal SC7271), anti-pAMPK α 1/2 (rabbit polyclonal, SC33524), anti-AMPK α 1/2 (rabbit polyclonal, SC25792), anti-G6Pase- β (mouse polyclonal SC134714), anti-PCB (mouse monoclonal SC271493), were imported from the *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA), anti-Alpha Tubulin (polyclonal rabbit #2144), anti-FOXO1 (rabbit monoclonal, #C29H4), anti-SIRT1 (mouse monoclonal #2028S), were imported from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA) and OXPHOS Roedent WB antibody cocktail were from ABCAM (AB 110413).

GSNO injection

S-nitrosoglutathione (GSNO) was prepared by the reaction of glutathione with sodium nitrite in acidic solution; the treatment was performed with 1 molar injection of GSNO via intraperitoneal 5 minutes before tissue extraction.

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.

Insulin tolerance test (ITT) and pyruvate tolerance test (PTT)

Before testing, all animals were fasted for 6 hours. Then the mice were submitted to an insulin tolerance test (ITT; 1.5 U/kg body weight of insulin). Briefly, 1.5 IU/kg of human recombinant insulin (Humulin R) from Eli Lilly (Indianapolis, IN) was injected intraperitoneally (i.p.), and blood samples were collected at 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min from the tail for blood glucose determination using a glucose meter (Advantage, Boehringer Mannheim, Germany). The rate constant for blood glucose disappearance (kITT) was calculated using the formula $0.693/\text{biological half-life (t}_{1/2})$. The blood glucose t_{1/2} was calculated from the slope of the last square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline (Bonora et al. 1989) (38).

The pyruvate tolerance test (PTT) was performed to estimate gluconeogenesis according to the following steps. The animals were fasted for 8 hours using a glucometer (Advantage, Boehringer Mannheim, USA). A first sample of glucose was

collected through the tail. After five minutes, the animals received an intraperitoneal injection of pyruvate (2g / kg) dissolved in 0.9% NaCl solution (Sigma®-Aldrich, St Louis, MO, USA). Glucose levels were measured after 30, 60 and 120 minutes and data plotted on a graph.

Immunofluorescence Staining

The Sections were incubated in blocking solution (1X TBS with 3% BSA) followed by overnight incubation with specific primary antibodies against INOS (1:50, Santa Cruz, CA, USA SC7271) and SIRT1 (1:50, Santa Cruz, CA, USA SC15404). Thereafter, secondary antibodies conjugated to Rhodamine (1:200 mouse Santa Cruz, CA, USA SC57606) and FITC (1:200 rabbit Santa Cruz, CA, USA SC2090) for SIRT1 and INOS respectively, were applied to the sections after TBS washes mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI (#H-1200 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). The images were acquired by immunofluorescence microscope Scope A1 from Zeiss using an image capture system with objective lens 40x.

Extraction of tissues

The mice were anesthetized with xilazin and ketamin and for anesthesia control we observed the pedal and corneal reflexes before any experimental procedure. Upon completion of the reflexes, the peritoneal cavity were opened for exposure of the portal vein. Liver and gastrocnemius muscle samples were extracted and homogenized in buffer containing 1% Triton X 100, 100mM Tris (pH 7.4), 100mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride sodium, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, and 0.1 mg / mL aprotinin at 4 ° C. The homogenate from each sample was then centrifuged at 11,000 RPM for 40 minutes. In the supernatant portion of the sample, the protein concentration was be determined using the Biuret method. Thereafter, the Laemmli buffer was added to each of the samples which were subsequently boiled or not for 5 minutes and stored at -80 ° C for further Western blot analysis.

Protein analysis by immunoblotting.

Samples were treated with Laemmli buffer containing 100mM DTT. They were then applied on polyacrylamide gel (SDS-PAGE 6%) in the minigel apparatus (Mini-Protean). A molecular weight marker was established with values established in myosin (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (80 kDa) and ovalbumin (49.5 kDa). Transfer of the separated proteins into the gel was done electrically onto a nitrocellulose membrane through a Bio-Rad apparatus for 1 hour and 30 minutes at 120 volts. In the buffer 0.1% SDS was added to improve the elution of high molecular weight proteins. Nonspecific binding of proteins to the nitrocellulose membrane was decreased by incubating these with a blocking solution (5% Molico skim milk, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0.02% Tween 20) at 4 ° C overnight. These membranes were then incubated with 2 ul secondary antibody and subsequently incubated with chemiluminescent solution (Pierce, CA). Reaction of the secondary antibody with the chemiluminescent solution was detected and visualized through the Syngene G: Box DR4V2 / 3154) apparatus. The intensity of the bands was quantified by optical densitometry through the Uniscan program. The number of animals used in each experiment was described in the legends of the figures.

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

Liver and skeletal muscle tissue were 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 μ l neutravidin-agarose 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 results were expressed as mean $\pm$ S.E.M. The results of the Western blot were presented as direct comparisons of the protein bands, which were quantified through densitometry using the Uniscan program. The data were analyzed through Student's t test, when two groups were compared. The statistical significance adopted was $p < 0.05$. The STATISTIC 6.0 program used to carry out the analyzes.

RESULTS

Intraperitoneal injection of GSNO induces S-nitrosylation SIRT1 in lean rodents.

Initially, we opted for the infusion of GSNO (a nitric oxide donor) (1 molar) intraperitoneally, 5 minutes before tissue extraction (experimental design A). This injection resulted in SIRT1 S-nitrosylation in both the liver and gastrocnemius muscle. We also observed that GSNO was able to reduce the phosphorylation of AMPK (Tre172) in the tissues in question (Fig. 1B and E). Administration of GSNO did not result in relevant modifications in the quantity of transcription factors PGC1a and pFOXO when compared to the control groups (Fig. 1C and F). On the other hand, the administration of GSNO increased the levels of the global acetylation profile in both the liver and muscle (Fig. 1D and G). These data demonstrated that nitric oxide induces SIRT1 S-nitrosylation in lean mice.

Obesity induced by high fat diet (HFD) induces S-nitrosylation of SIRT1 protein.

Next, we evaluated the effects of obesity on SIRT1 S-nitrosylation in the liver and muscle of mice. For this, wild-type mice (C57BL6 / J) were fed high-fat diet

(HFD) for 8 weeks plus 10% sucrose (water) in the 15 days prior to the experiments (Experimental Design A), we verified a difference in body composition through image (Fig. 2B). After the HFD treatment, we observed a significant increase in body weight (Fig. 2C), followed by a non-significant reduction in oxygen consumption and a significant reduction in carbon dioxide production in light and dark cycles, as well an increased respiratory exchange ratio when compared to control group (Fig. 2D-G). Obese animals showed significant insulin resistance (Fig. 2H). Moreover, the animals had greater glucose production during the pyruvate tolerance test (Fig. 2K). Interestingly, these metabolic disorders were accompanied by the increase of SIRT1 S-nitrosylation in the liver and gastrocnemius, in parallel to the S-nitrosylation of SIRT1, we observed an increase of iNOS besides a significant reduction of the protein content of SIRT1. The S-nitrosylation of SIRT1 was also accompanied by the reduction of pFOXO1 in both tissues in addition to a strong increase in PGC1a in the liver followed by its decrease in the gastrocnemius (Fig. 2M and S), and substantial reduction of AMPK phosphorylation (Fig. 2 T and N), an increase in glyconeogenesis markers G6Pase and PCB in the liver (Fig. 2O), as well as the reduction of several components of mitochondrial complexes (Fig. 2 P and U), In addition, the increase of acetylation in the tissues was detected (Fig 2. Q and V). We also evaluated the colocalization of iNOS and SIRT1 with immunofluorescence microscopy, and finally we observed the increase of fat droplets in the liver and damage in the fibers in the gastrocnemius muscle in animals fed a high fat diet (Fig 2. R and X).

Evaluation of S-nitrosylation of SIRT1 in the liver and gastrocnemius of ob/ob mice.

In the next step we sought to evaluate the SIRT1 S-nitrosylation in genetically obese animals (*ob/ob*). Fig. 3A. experimental design. We observed an increase in SIRT1 S-nitrosylation in skeletal muscle and liver, reduction of the SIRT1 protein content and phosphorylation of AMPK (Fig. 3B and E) in *ob/ob* mice. Figure 3C and F shows that there was an increase of PGC1a followed by a reduction of pFOXO in hepatic tissue and a reduction of these transcription factors in skeletal muscle tissue and acetylation is strongly evidenced in the *ob/ob* group (Fig. 3D and G).

iNOS^{-/-} mice display low levels of SIRT1 S-nitrosylation.

It has been shown that iNOS knockout mice (iNOS^{-/-}) were protected from developing insulin resistance even when exposed to the high fat diet (HFD) of addition these mice presented low levels of IR, IRS-1 and Akt S-nitrosylation in skeletal muscle, when compared to wild-type mice (39). Similar results were found by Ropelle et al. in the aged mice (34), and also recently demonstrated by Katashima and colleagues (40) that obesity promoted S-nitrosylation of the insulin pathway proteins, while inhibition of iNOS restored hypothalamic insulin signaling. Based on this information we hypothesized that iNOS^{-/-} mice may protected from SIRT1 S-nitrosylation. In order to verify this hypothesis, wild-type and iNOS^{-/-} mice were fed on high fat diet (HFD) for 8 weeks plus sucrose 10% (water) in the 15 days before the experiments (experimental design A).

The iNOS^{-/-} animals presented lower body weight gain, followed by a significant reduction in fasting glycemia (Fig. 4B and C). Interestingly, we observed lower levels of SIRT1 S-nitrosylation in both, the liver and in the gastrocnemius of iNOS^{-/-} animals. iNOS^{-/-} animals showed a significant increase of SIRT1 protein levels as well as in the phosphorylation of AMPK (Fig. 4D and F). These animals also demonstrated a reduction in acetylation in the two tissues (Fig. 4E and G). These data indicate that iNOS^{-/-} animals were partially protected from SIRT1 S-nitrosylation during obesity.

DISCUSSION

In the present study, we identified that Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) is directly associated with SIRT1 S-nitrosylation in the liver and skeletal muscle of mice. Elevation was observed both in the expression of iNOS and SIRT1 S-nitrosylation in these two tissues of mice fed with a high fat diet. S-nitrosylation of SIRT1 was associated with mitochondrial abnormalities and insulin resistance in liver and skeletal muscle. Our findings revealed that genetic approaches to iNOS activity/expression were enough to prevent SIRT1 S-nitrosylation, maintaining mitochondrial markers and insulin sensitivity in the tissues studied in obese mice. Taken together, these data suggest that iNOS is an enzyme that determines the obese phenotype. These tissues have remarkably mitochondrial density capable of inducing the energy expenditure and uses lipid or glucose to produce energy. In this context, SIRT1 appears as a central enzyme responsible for controlling mitochondrial

biogenesis, fatty acid oxidation and glucose metabolism (41). SIRT1 exerts its function by reducing the acetylation of PGC1 α . Later, PGC1 α increases mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation through its downstream targets (25). In addition, it has been proposed that SIRT1 and AMPK have a reciprocal effect whereas AMPK and SIRT1 can activate one another has an interdependence (3) whereas SIRT1 promotes phosphorylation of AMPK and AMPK mediates its biological effects through of the activation of SIRT1 (28, 42). It is important to note that, under inflammatory conditions, the expression and/or activity of the deacetylase SIRT1 are markedly affected in different tissues and cell types (43), however, the molecular mechanism by which inflammation disrupts SIRT1 activity remains uncertain. It has been proposed that the inflammatory activity triggers SIRT1 cleavage induced by inflammation in adipocytes (44, 45). In addition, in a preliminary study, the Kaneki group provided the first evidence that, after inflammatory stimuli, iNOS suppressed SIRT1 activity in vitro through the S-nitrosylation mechanism (16). The use of the NO donor (GSNO) performed in our study confirmed that nitric oxide induces SIRT1 S-nitrosylation, while the specific mutation in two cysteine residues, Cys387 and Cys390, cancels out the effects of GSNO on SIRT1 S-nitrosylation in in vitro) (16). Our findings demonstrated that, during inflammation conditions, such as obesity, iNOS induces S-nitrosylation SIRT1, impairing its activity in the liver and skeletal muscle, contributing to mitochondrial dysfunction and insulin resistance.

The role of iNOS in the induction of S-nitrosylation of proteins is relatively well documented. In addition, the iNOS is associated with protein S-nitrosylation in chronic inflammation models, including obesity (32, 34). Our study demonstrated that mice with genetically-induced obesity showed an increase in SIRT1 S-nitrosylation in liver and muscle, in addition, the iNOS^{-/-} mice fed a high fat diet were protected from SIRT1 S-nitrosylation promoting an improvement in mitochondrial markers and insulin sensitivity. Becerril and colleagues reported that iNOS^{-/-} mice had higher energy expenditure and mitochondrial markers, including uncoupling proteins 1 and 3 (Ucp-1 and Ucp-3) in brown adipose tissue (35, 36), solidifying the fact that aberrant iNOS expression has a negative impact on energy expenditure and mitochondrial metabolism.

The role of NO in controlling mitochondrial function and biogenesis is broad and complex. In fact, NO has a negative effect on mitochondrial respiratory capacity, as we observed in our models, however, we can not exclude that NO also reduces

mitochondrial function acting directly on mitochondrial complexes, since NO diffuses from cytosol to mitochondria and vice versa (46). Studies have shown that NO inhibits the electron transport chain in complexes I, III and IV by different mechanisms (47, 48). On the other hand, several studies have shown that NO has a positive effect on mitochondrial biogenesis through the PGC1 α -dependent mechanism (48, 49). In agreement with our findings, other studies also found that nitric oxide promotes a negative regulation of PGC1 α activity (50, 51).

Taken together, our results provide substantial evidence that S-nitrosylation may be a common mechanism for the regulation of SIRT1 activity and that inhibition of iNOS represents a potential target for improving mitochondrial function in cases of obesity.

Author Contributions

L.L. researched data contributed to discussion and reviewed/edited manuscript. J.D.B. researched data. C.K.K. researched data. V.R.R.S. researched data. B.M.C. researched data. A.V.C. researched data. J.A.C. researched data. M.J.S contributed to discussion and reviewed/edited manuscript. A.S.R.S contributed to discussion and reviewed/edited manuscript J.R.P. contributed to discussion and reviewed/edited manuscript. D.E.C. researched data and contributed to discussion and reviewed/edited manuscript. L.P.M researched data and contributed to discussion and reviewed/edited manuscript E.R.R. wrote the manuscript, contributed to discussion and reviewed/edited manuscript

Acknowledgments

This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

1. Elahi D, Muller DC. Carbohydrate metabolism in the elderly. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54 Suppl 3:S112-20.
2. Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Ann Med.* 2011;43(3):198-211.
3. Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakai C, Coste A, Lagouge M, et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2010;11(3):213-9.
4. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, et al. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell.* 2004;116(4):551-63.
5. Brunet A. A CRTCα link between energy and life span. *Cell Metab.* 2011;13(4):358-60.
6. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2α promotes cell survival under stress. *Cell.* 2001;107(2):137-48.
7. Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2008;283(29):20015-26.
8. Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, Albarado DC, Thomas SC, Xie H, et al. Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(1):E117-26.
9. Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, et al. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell.* 2008;14(5):661-73.
10. Gomes AP, Price NL, Ling AJ, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, et al. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell.* 2013;155(7):1624-38.
11. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* 2011;14(5):612-22.
12. Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* 2008;8(5):347-58.

13. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. *Nature*. 2010;464(7293):1313-9.
14. Gariani K, Menzies KJ, Ryu D, Wegner CJ, Wang X, Ropelle ER, et al. Eliciting the mitochondrial unfolded protein response by nicotinamide adenine dinucleotide repletion reverses fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 2016;63(4):1190-204.
15. Cao Y, Jiang X, Ma H, Wang Y, Xue P, Liu Y. SIRT1 and insulin resistance. *J Diabetes Complications*. 2016;30(1):178-83.
16. Kornberg MD, Sen N, Hara MR, Juluri KR, Nguyen JV, Snowman AM, et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1094-100.
17. Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, et al. Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. *Sci Signal*. 2014;7(351):ra106.
18. Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(4):295-309.
19. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, da Silva AS, Moraes JC, et al. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(5):323-9.
20. Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell*. 2008;132(2):171-6.
21. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:253-95.
22. Houtkooper RH, Cantó C, Wanders RJ, Auwerx J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev*. 2010;31(2):194-223.
23. Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med*. 2001;7(10):1138-43.
24. Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T, et al. Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science*. 2013;339(6124):1216-9.

25. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*. 2006;127(6):1109-22.
26. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab*. 2007;6(4):307-19.
27. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007;450(7170):712-6.
28. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-60.
29. Benhar M, Forrester MT, Stamler JS. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(10):721-32.
30. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest*. 1997;100(10):2417-23.
31. Mitchell DA, Erwin PA, Michel T, Marletta MA. S-Nitrosation and regulation of inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 2005;44(12):4636-47.
32. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IR β /IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(3):E476-82.
33. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005;54(4):959-67.
34. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, da Silva AS, De Souza CT, Guadagnini D, et al. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes*. 2013;62(2):466-70.
35. Becerril S, Rodríguez A, Catalán V, Sáinz N, Ramírez B, Gómez-Ambrosi J, 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. *Physiol Genomics*. 2012;44(13):678-88.

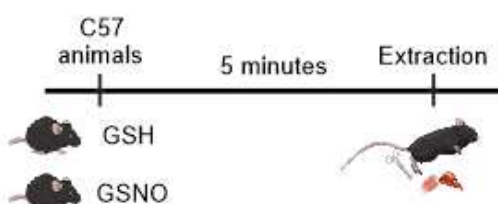
36. Becerril S, Rodríguez A, Catalán V, Sáinz N, Ramírez B, Collantes M, et al. Deletion of inducible nitric-oxide synthase in leptin-deficient mice improves brown adipose tissue function. *PLoS One*. 2010;5(6):e10962.
37. Sinitskaya N, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Gormelen S, Pévet P, Challet E. Short day-length increases sucrose consumption and adiposity in rats fed a high-fat diet. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(9):1269-78.
38. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68(2):374-8.
39. Carvalho-Filho MA, Ropelle ER, Pauli RJ, Cintra DE, Tsukumo DM, Silveira LR, 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*. 2009;52(11):2425-34.
40. Katashima CK, Silva VRR, Lenhare L, Marin RM, Carvalheira JBC. iNOS promotes hypothalamic insulin resistance associated with deregulation of energy balance and obesity in rodents. *Sci Rep*. 2017;7(1):9265.
41. Yu J, Auwerx J. The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173 Suppl 1:E10-9.
42. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012;15(5):675-90.
43. Dvir-Ginzberg M, Gagarina V, Lee EJ, Hall DJ. Regulation of cartilage-specific gene expression in human chondrocytes by SirT1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem*. 2008;283(52):36300-10.
44. Chalkiadaki A, Guarente L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab*. 2012;16(2):180-8.
45. Serrano-Marco L, Chacón MR, Maymó-Masip E, Barroso E, Salvadó L, Wabitsch M, et al. TNF- α inhibits PPAR β/δ activity and SIRT1 expression through NF- κ B in human adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(9):1177-85.
46. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):214-20.

47. Boveris A, Costa LE, Poderoso JJ, Carreras MC, Cadenas E. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:121-35.
48. Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(47):16507-12.
49. McConell GK, Ng GP, Phillips M, Ruan Z, Macaulay SL, Wadley GD. Central role of nitric oxide synthase in AICAR and caffeine-induced mitochondrial biogenesis in L6 myocytes. *J Appl Physiol* (1985). 2010;108(3):589-95.
50. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α . *FASEB J.* 2006;20(11):1889-91.
51. Borniquel S, García-Quintáns N, Valle I, Olmos Y, Wild B, Martínez-Granero F, et al. Inactivation of Foxo3a and subsequent downregulation of PGC-1 α mediate nitric oxide-induced endothelial cell migration. *Mol Cell Biol.* 2010;30(16):4035-44.

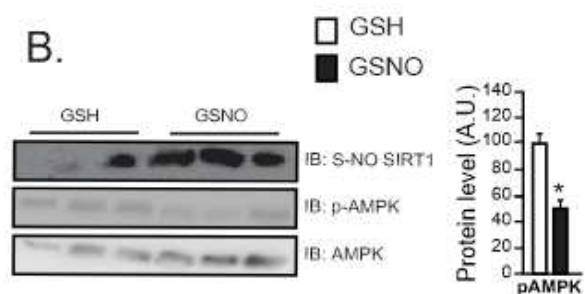
FIGURES

Figure 1. (LIVER)

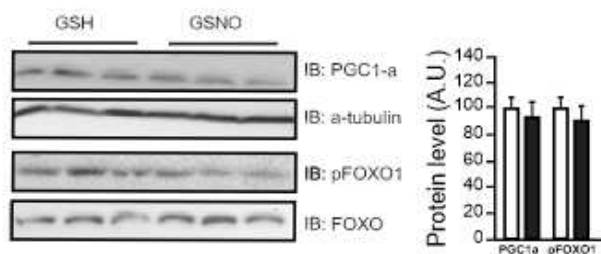
A. Experimental design



B.



C.



D.

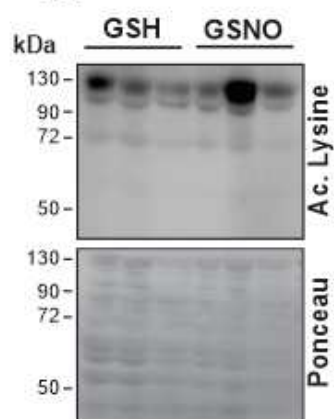


Figure 1. (GASTROCNEMIUS)

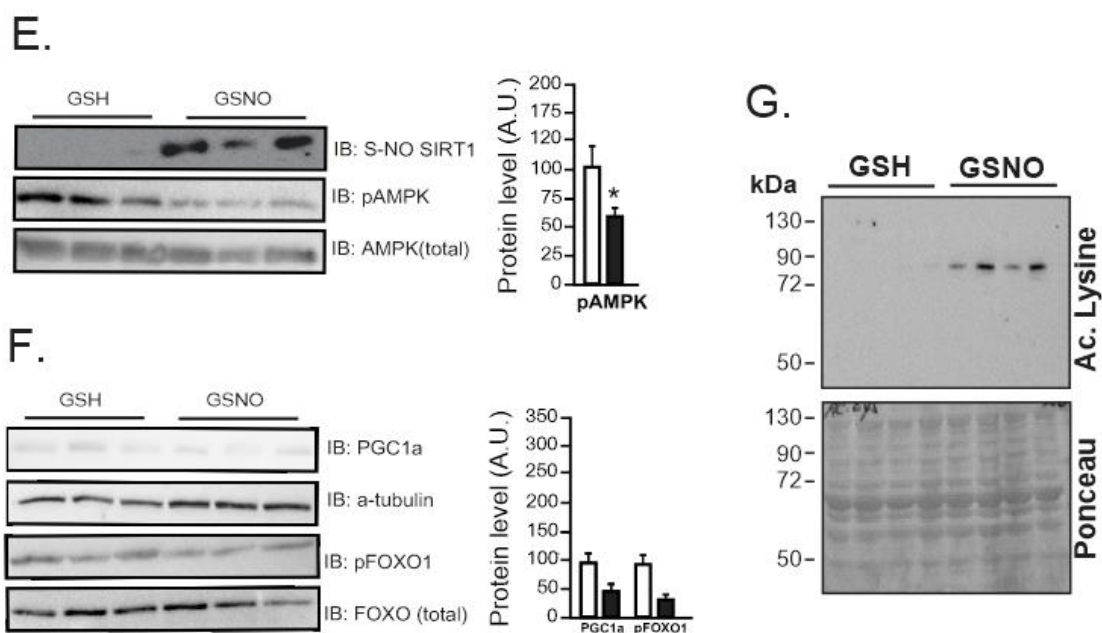
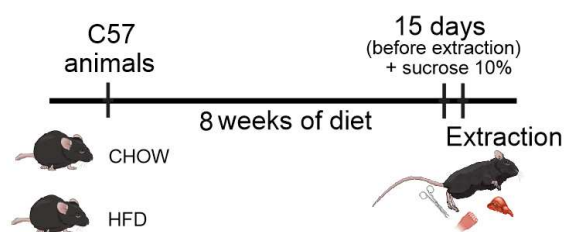
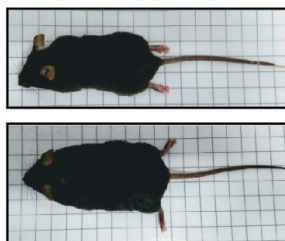


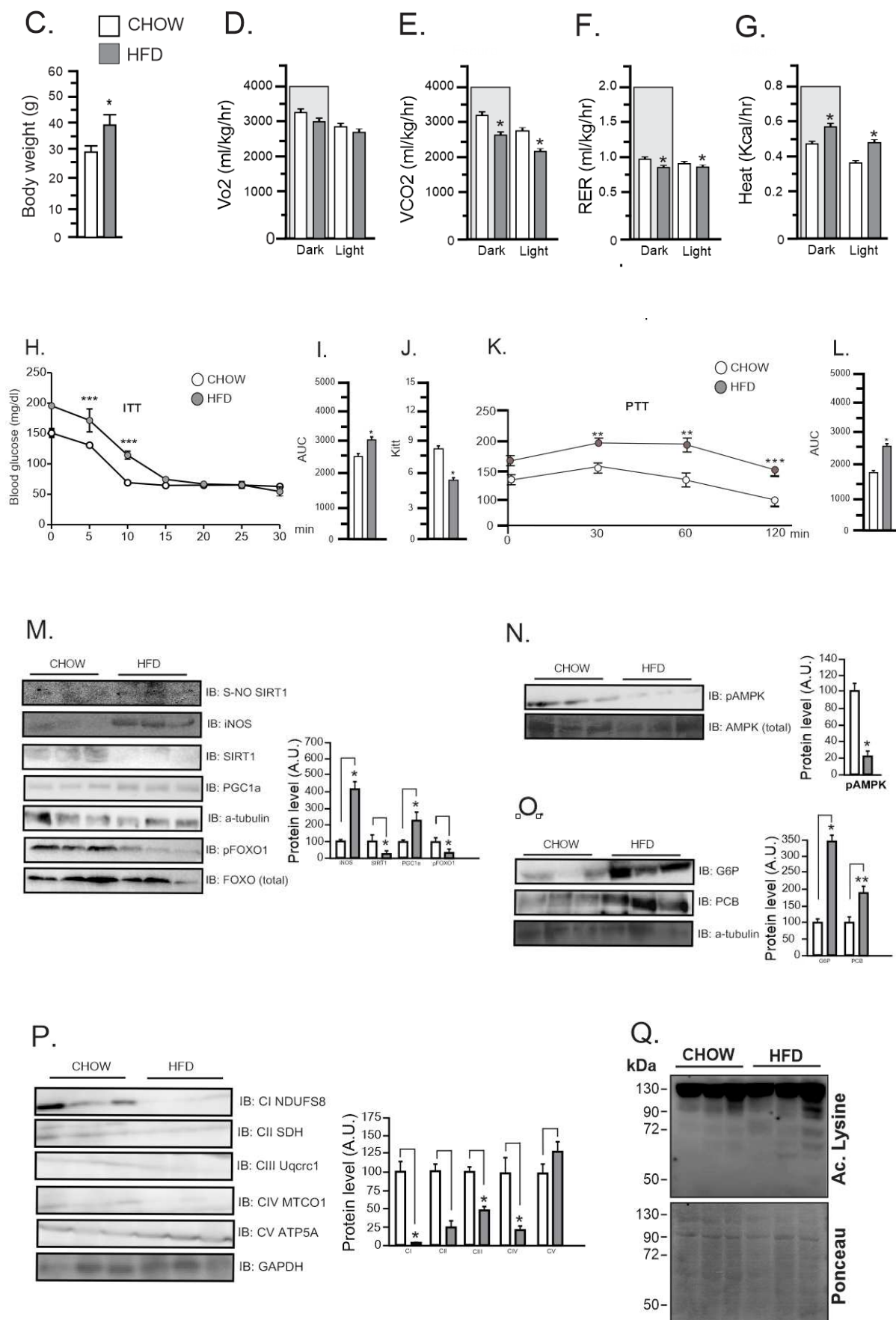
Figure 2. (LIVER)

A. Experimental design



B.





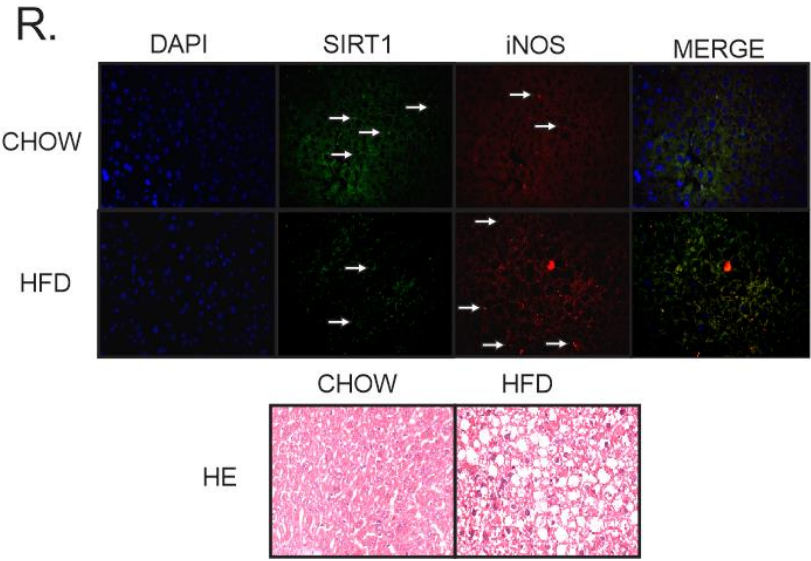
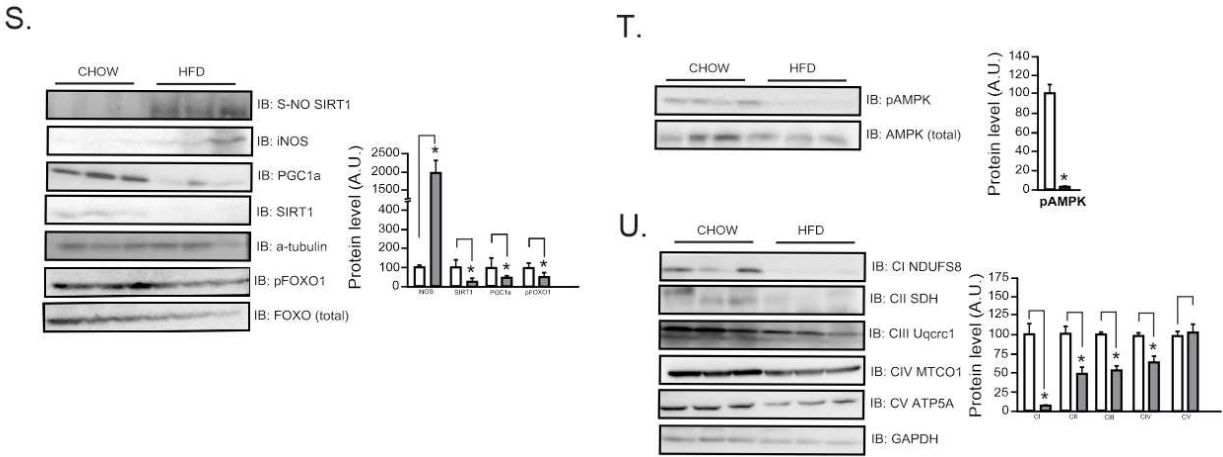


Figure 2. (GASTROCNEMIUS)



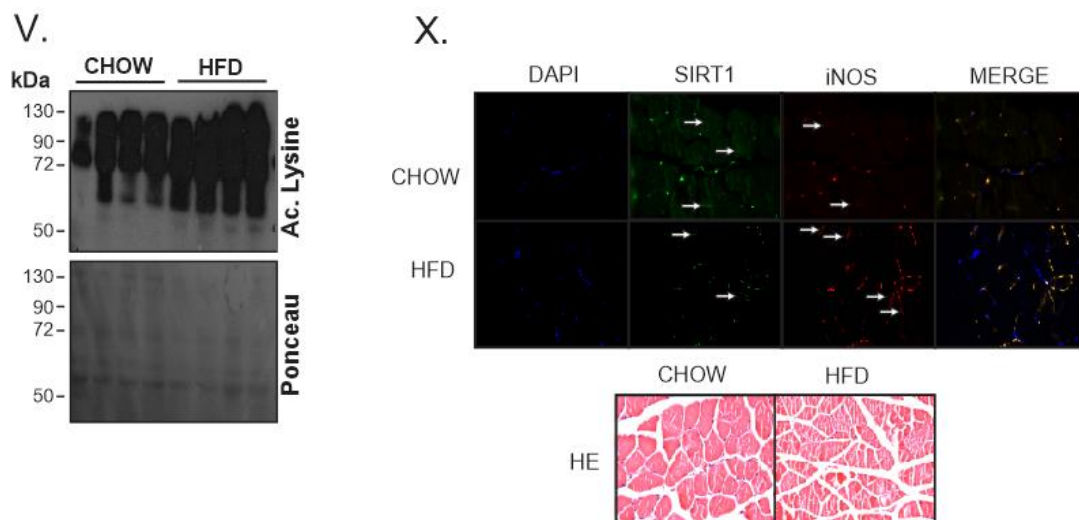
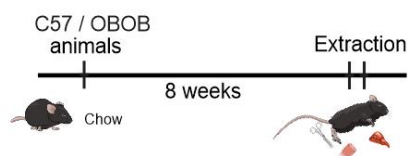
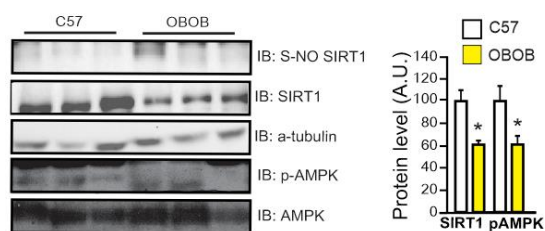


Figure 3. (LIVER)

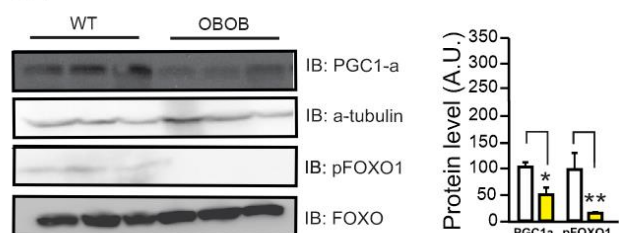
A. Experimental design



B.



C.



D.

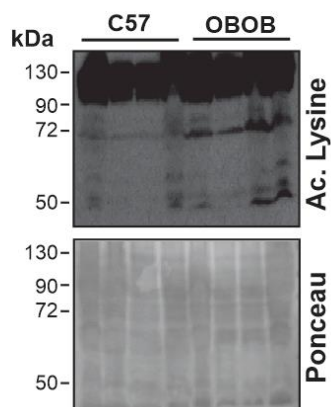


Figure 3. (GASTROCNEMIUS)

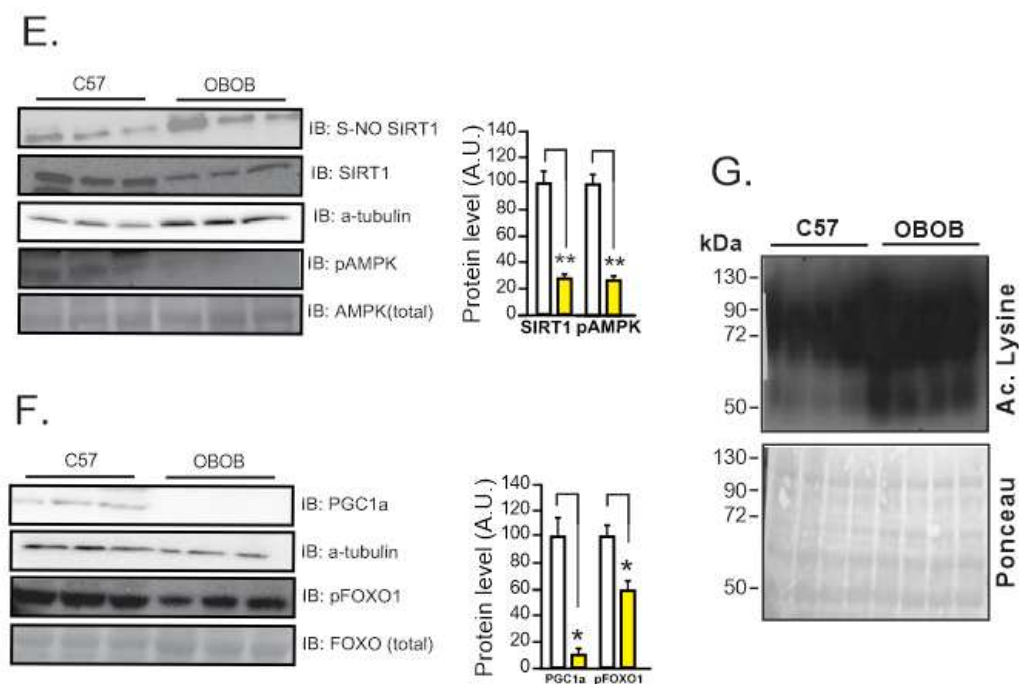
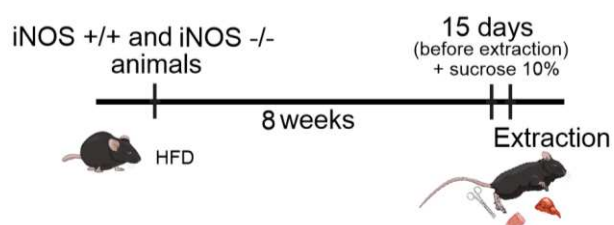
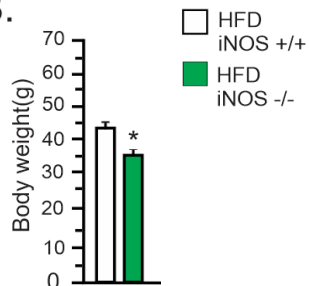


Figure 4. (LIVER)

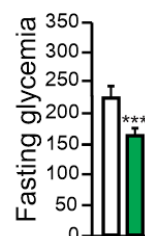
A. Experimental design



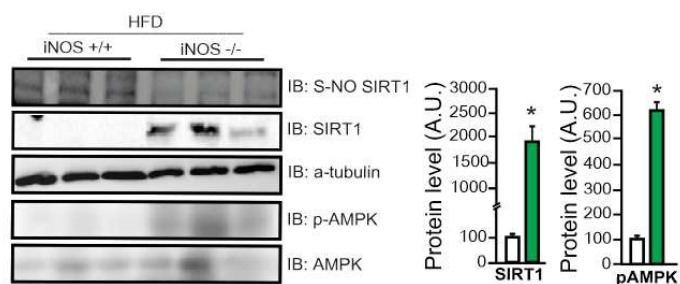
B.



C.



D.



E.

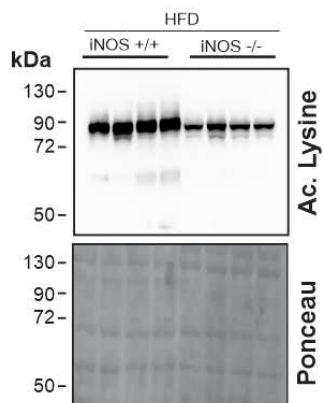
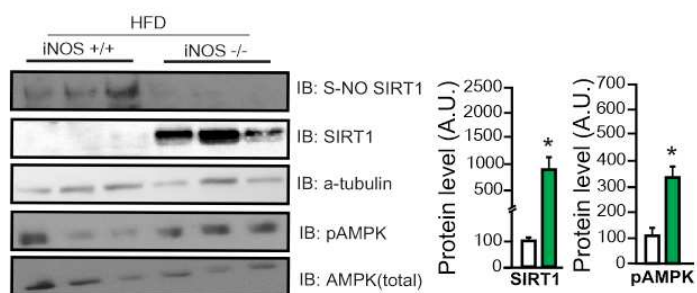
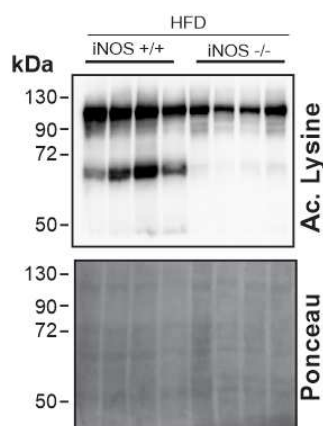


Figure 4. (GASTROCNEMIUS)

F.



G.



FIGURES LEGENDS

Figure 1. Mice with 8 weeks of life received 0.5 mol / l intraperitoneal NO S-nitrosoglutathione at the time 5 minutes prior to tissue extraction (experimental design A). Evaluation of S-nitrosylation of SIRT1 and phosphorylation of AMPK (B and E) transcriptional factors (C and F) and pattern of global protein acetylation (D and G). For these physiological analyses n=5, for the WB analyses n=3-4 mice per group. *p<0.05 vs. GSH.

Figure 2. Experimental desing (A). Image of C57 mice fed with chow diet and hyperlipid diet (B), body weight (C) determination of O₂ (D) consumption, CO₂ (E) production, respiratory exchange rate (F) and heat production by the Panlab gas analyzer (G). Insulin tolerance test, area under curve and glycemia decay rate (kITT) (H, I and J). Pyruvate tolerance test and area under the curve (K and L). For these physiological analyses n= 4-5, mice per group. *p<0.05 vs. CHOW and ** p<0.01 vs. CHOW. S-nitrosylation of SIRT1 protein in hepatic and gastrocnemius tissues, respectively, expression of iNOS, total content of SIRT1 and the transcription factors PGC1 α and pFOXO1 (M and S). Phosphorylation of AMPK (N and T). Evaluation of proteins related to gluconeogenesis (O), mitochondrial complexes (P and U), pattern of global protein acetylation (Q and V). Co-localization of the SIRT1 with iNOS and analysis of the droplets of fat and muscle fibers in the hepatic and muscular tissues (R and X). For these physiological analyses n=5, for the WB analyses n=3-4 mice per group. *p<0.05 vs. CHOW and ** p<0.01 vs. CHOW.

Figure 3. C57 wild-type mice were compared to ob/ob in the hepatic and muscular tissues (experimental desing A). We observed SIRT1 S-nitrosation in both tissues, evaluation of total content of SIRT1 and phosphorylation of AMPK (B and E), transcriptional factors (C and F), pattern of global protein acetylation (D and G). 5 animals per group. Data were expressed by using mean $\pm$ S.E.M. # p<0.05, vs control. For these physiological analyses n=5, for the WB analyses n=3-4 mice per group. *p<0.05 vs. C57 and ** p<0.01 vs. C57.

Figure 4. Experimental desing (A), body weight and fasting glycemia (B), evaluation s-nitrosylation of SIRT1 in liver and gastrocnemius, evaluation of total SIRT1 content and phosphorylation of AMPK protein (D and F) and pattern of global protein

acetylation (E and G). For these physiological analyses $n=5$, for the WB analyses $n=3-4$ mice per group. * $p<0.05$ vs. iNOS^{+/+} and ** $p<0.01$ vs. iNOS^{+/+}.

(artigo 2)

PHYSICAL EXERCISE REDUCES SIRT1 S-NITROSYLATION IN OBESE MICE.

Luciene Lenhare^{1,2}, Vagner R. R. Silva¹, Barbara M. Crisol¹, André Victor Cordeiro¹, Rafael C. Gaspar¹, Vitor R. Muñoz¹, Carlos K. Katashima², Juliana A. Camargo², Mario J. Saad², Adelino S. R. da Silva³, Dennys E. Cintra⁴, Leandro P de Moura^{1,4}, José R. Pauli^{1,5}, Eduardo R. Ropelle^{1,2,5}.

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.

3. Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

4. Laboratory of Nutritional Genomics (LabGeN), School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, SP, Brazil.

5- CEPECE - Center of Research in Sport Sciences. School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, 13484-350, Brazil.

Running head: Exercise decreases SIRT1 S-nitrosylation.

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 emerged as promising target to prevent or treat a variety of metabolic disorders. Several studies demonstrate the reduction of SIRT1 activity in obesity and diabetes models. Recently, it has been proposed that S-nitrosylation is involved in the reduction of SIRT1 activity *in vitro* and *in vivo*. In the present study we evaluated the effect of 8 weeks of exercise on SIRT1 S-nitrosylation in the liver and skeletal muscle of obese mice. We observed that a chronic exercise was able to reduce S-nitrosylation of SIRT1 in the liver and skeletal muscle of obese mice. These data were accompanied by low levels of global protein acetylation and higher levels of mitochondrial markers in the liver and skeletal muscle after the exercise protocol. Collectively, our data suggests that chronic exercise increases SIRT1 activity, at least in part, by reducing the S-nitrosylation of this protein.

Keywords: SIRT1, S-nitrosylation, obesity, exercise.

INTRODUCTION

The sedentary lifestyle is among the most important risk factors that leading to an unprecedented increase in the prevalence of obesity. The prevalence of obesity is associated with various types of diseases, such as type 2 diabetes, cardiovascular disease, respiratory disease and cancer (1-4), considering that obesity is the main responsible factor for the establishment of metabolic syndrome. Thus, strategies to reduce this public health problem is a point of great current relevance (4, 5).

In this sense, a protein that has been emerging is SIRT1. The Sirtuins (Sir) are a family of NAD⁺ dependent histone/protein deacetylases that extend the life span in yeast and worms (6). SIRT1 is involved in several physiological functions, including control of gene expression, cell cycle regulation, apoptosis, DNA repair, metabolism, oxidative stress response and aging (7). SIRT1 deacetylates non-histone proteins such as p53 and FOXO1 (Forkhead box protein O1) 12. SIRT1 can participate in the antiinflammatory process by deacetylating NFκB, in particular its subunit, transcription factor p65 (8). Increased acetylation of transcription factor p65 is closely correlated with a decrease in SIRT1 level (9).

Parallel to this inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a major downstream mediator of inflammation in different cell types (10). Several authors have shown that inhibition of iNOS by gene disruption or pharmacological inhibitors ameliorates obesity and stress leading to insulin resistance in rodents (11-15). Protein S-nitrosylation is the covalent attachment of nitric oxide (NO) fraction to the reactive cysteine thiols and a major mediator of physiological and pathophysiological actions of NO (16). Recent study has demonstrated that iNOS-mediated S-nitrosylation of SIRT1, inactivates it and thereby increases acetylation and activity of p65 subunit of nuclear factor (NF)-κB and p53 (17). This same group has shown that in a rodent model of LPS-induced systemic inflammation and age-related muscle wasting increased S-nitrosylation of SIRT1 and the associated activation of p65 NF-κB and p53 require the activity of iNOS.

On the other hand, studies indicated that regular physical exercise favors glycemic homeostasis in diabetic individuals, being an important component for the treatment of obesity and type 2 DM (18). In human and experimental animal models, aerobic training increases insulin-stimulated glucose uptake (19, 20) contributing to

glucose homeostasis. Several mechanisms may increase glucose uptake in response to exercise. Including increased blood flow, increased insulin binding to its membrane receptor (IR), increased AMPK activity, and others (19, 21-23). Thus, we sought to determine the effects of physical exercise on levels of SIRT1 S-nitrosylation in the obese mice, in parallel, we established the link between SIRT1 S-nitrosylation, mitochondrial biogenesis, and other parameters controlled by SIRT1 in the liver and skeletal muscle.

METHODS

Animals

Male mice C57BL6 / J from Jackson Laboratory (C57BL / 6-Nos2tm1Lau colony), as approved by the committee of ethics CEUA / UNICAMP (4251-1). All animals were housed in individual cages and maintained in a light and dark cycle of 12:12 hours and housed in cages between 22-24 ° C. The clear cycle began at 6:00 in the morning. The animals were given free water access to high-fat diet (5358 Kcal / kg) for 8 weeks and 15 days prior to the experiments the animals received sucrose 10% in water, as previously described (24).

Reagents and Antibodies

The reagents and apparatus for the gel of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) were from 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®) manufactured Elli by Lilly Co. (Indianapolis, IN). The nitrocellulose membrane (BA85, 0,2.m) was used Schleicher & Schuell. The anti-Acetyl Lysine (mouse monoclonal SC81623) anti-PGC1 α (rabbit polyclonal, SC13067), anti-pAMPK α 1/2 (rabbit polyclonal, SC33524), anti-AMPK α 1/2 (rabbit polyclonal, SC25792), anti-Uqcrc1 (goat polyclonal SC69060) were imported from the *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA), anti-AlphaTubulin (polyclonal rabbit # 2144), anti-FOXO1 (rabbit monoclonal, # C29H4), anti-SIRT1 (mouse #2028S) were imported from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA), and the anti-MTCO1

(mouse monoclonal, Ab 14795), was imported from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, USA).

Physical exercise protocol

Adaptation protocol and workloads determination.

The wild type and obese mice were adapted to the treadmill running during 5 consecutive days (10 min/day at a speed of 3 m/min). Mice were submitted to incremental exercise test on a motor treadmill (Avs projects – Brazil). The intensity of exercise was increased by 3 m/min every 3 min at 0% grade until exhaustion. This test provided the total distance run and the peak workload was measured at the end of the test. Individual workloads corresponding to 60% peak workload were determined. The physical exercise training protocol consisted of 8 weeks the animals performed a daily and consecutive exercise session 5 times per week. Twenty-four hours after the last physical exercise session, the animals were submitted to hepatic and skeletal tissue extraction to analysis.

Extraction of tissues

The mice were anesthetized with sodium thiopental (4mg / 100g body weight) and for anesthesia control we observed the pedal and corneal reflexes before any experimental procedure. Liver, gastrocnemius muscle and adipose tissue samples were extracted and homogenized in buffer containing 1% Triton X 100, 100mM Tris (pH 7.4), 100mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride sodium, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, and 0.1 mg / mL aprotinin at 4 ° C. The homogenate from each sample was then centrifuged at 11,000 RPM for 40 minutes. In the supernatant portion of the sample, the protein concentration was determined using the Biuret method. Thereafter, the Laemmli buffer was added to each of the samples which were subsequently boiled or not for 5 minutes and stored at -80 ° C for further Western blot analysis.

Protein analysis by immunoblotting.

Samples were treated with Laemmli buffer containing 100mM DTT. They were then applied on polyacrylamide gel (SDS-PAGE 6%) in the minigel apparatus (Mini-Protean). A molecular weight marker was established with values established in

myosin (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (80 kDa) and ovalbumin (49.5 kDa). Transfer of the separated proteins into the gel was done electrically onto a nitrocellulose membrane through a Bio-Rad apparatus for 1 hour and 30 minutes at 120 volts. In the buffer, 0.1% SDS was added to improve the elution of high molecular weight proteins. Nonspecific binding of proteins to the nitrocellulose membrane was decreased by incubating these with a blocking solution (5% Molico skim milk, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0.02% Tween 20) at 4 ° C overnight. These membranes were then incubated with specific primary antibody overnight at 4°C, the incubated with 2 ul of secondary antibody and subsequently incubated with chemiluminescent solution (Pierce, CA). Reaction of the secondary antibody with the chemiluminescent solution was detected and visualized through the Syngene G: Box DR4V2 / 3154) apparatus. The intensity of the bands was quantified by optical densitometry through the Uniscan program. The number of animals used in each experiment was described in the legends of the figures.

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

Liver and gastrocnemius were 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 methylethanesulphonate) 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 μ l 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 98% 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 results were express as mean $\pm$ S.E.M. The results of the Western blot or immunoblot were presented as direct comparisons of the protein bands, which were quantified through densitometry using the Uniscan program. The data was analyzed through Student's t test, when two groups were compared. The statistical significance adopted was $p < 0.05$. The STATISTICA 6.0 program was used to carry out the analyzes.

RESULTS

Exercise reduces body fat in obese mice.

Initially the mice were fed a high fat diet (HFD) during 8 weeks. Thereafter we submitted a group of mice to a 5-day adaptation to the exercise protocol (treadmill), followed by 2 days of rest and subsequent maximum incremental load test. The animals subsequently rested for 2 days and then were submitted to the physical exercise protocol of 8 weeks, 24 hours after the last exercise session the animals were euthanized, and the adipose tissue, livers and gastrocnemius were extracted for analysis. The experimental desing is demonstrated in the figure (1A). We observed that the trained mice became lighter when compared to untrained in a significant weight loss (1B) of adipose tissue, we verified substaniated changes in the weight of the retroperitoneal and epidydimal fat of the trained animals (1B).

Physical exercise reduces SIRT1 S-nitrosylation in obese mice.

Molecular analysis revealed that SIRT1 protein levels were elevated in trained obese mice compared to non-trained obese, respectively, in hepatic and muscular tissues, these results were accompanied by low levels of SIRT1 S-nitrosylation in

obese exercised animals in parallel, these mice showed a significant increase in AMPK phosphorylation (Fig. 2A and E), as well as in the two mitochondria complexes related to ATP synthesis and beta-oxidation MTCO1 and Uqcrc1 (Fig. 2C and G). The transcription factor PGC1 α and FOXO1 presented strong alterations (Fig 2B and F) and, finally, the obese mice submitted to the exercise protocol presented lower levels of global protein acetylation in the liver and gastrocnemius (Fig. 2D and H). These data demonstrated that physical exercise reduced SIRT1 S-nitrosylation and apparently increased the SIRT1 activity in the liver and muscle of obese mice.

DISCUSSION

Obesity is a disease that grows at an alarming rate and is associated with insulin resistance and the development of chronic diseases such as cardiovascular disease, some cancers and type 2 diabetes mellitus. Therefore, the understanding of the molecular mechanisms related to this disease becomes essential to reduce or reverse the progression of this alarming epidemiological reality. Insulin resistance can be established in skeletal muscle and hepatic tissue, contributing to initiate a change in postprandial glycemia and subsequently in fasting glycemia.

Recently, a protein named SIRT1 was described as a molecule with several biological functions, among them; control of inflammation, genetic silencing, apoptosis, cellular metabolism and DNA repair (25). SIRT1 has emerged as a promising therapeutic target in the fight against a number of metabolic disorders including obesity and diabetes, since this enzyme promotes anti-inflammatory effects, improves insulin sensitivity and mainly increases mitochondrial biogenesis through deacetylation and activation of co-activator 1 alpha of the peroxisome proliferator-activated receptor (PGC-1-alpha) (26, 27).

In this way in the present study, we investigated the effect of eight weeks of physical exercise training in the S-nitrosylation of SIRT1, on acetylation, on mitochondrial function and on insulin sensitivity in the liver and skeletal muscle in obese mice. In the present study we identified that 8 weeks of treadmill exercise was able to reduce in part the S-nitrosylation of SIRT1 in the liver and skeletal muscle of obese mice. We observed that the practice of physical exercise despite not having reduced the body weight, was able to reduce important fat depots. We also verified

that exercised mice had reduction in S-nitrosylation of SIRT1 protein and this reduction was associated with improvement in mitochondrial markers in the liver and gastrocnemius.

Our findings revealed that approaches such as physical training were able to reverse/prevent SIRT1 S-nitrosylation by maintaining SIRT1 content and mitochondrial function in the tissues in question. These tissues have a remarkable mitochondrial density capable of inducing energy expenditure and use lipids or glucose to produce energy. In this context, SIRT1 appears as a central enzyme responsible for the control of mitochondrial biogenesis, fatty acid oxidation and glucose metabolism (28). SIRT1 exerts its function by reducing the acetylation of PGC1 α . Later, PGC1 α increases mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation through its downstream targets (29). Interestingly our data showed that global protein acetylation in the obese exercised animals were visually attenuated when compared to their control. In addition, it has been proposed that SIRT1 and AMPK have a reciprocal effect and can activate one another (30) whereas SIRT1 promotes phosphorylation of AMPK and AMPK mediates its biological effects through the activation of SIRT1 (31, 32) corroborating with our results.

The literature shows that obese animals have a high production of glucose (gluconeogenesis) in their phenotype (33, 34). To understand the mechanism of how exercise decreases gluconeogenesis we must first understand that in cases of obesity the action of insulin is impaired, as several studies have shown to cause insulin resistance and type 2 diabetes mellitus increasing concentration and activity of G6Pase in the liver, leading to an increase in glucose synthesis (35, 36). FOXO1 has a negative action on insulin signaling. Phosphorylation of this results in a nuclear extrusion and its subsequent inactivation (37, 38). FOXO1 overexpression increases G6Pase expression causing an increase in glucose synthesis, culminating in insulin resistance. According to our results, physical exercise was able to promote increased phosphorylation of FOXO1. These changes are strongly related to the reduction of gluconeogenesis and consequently improve in metabolic homeostasis.

Author Contributions

L.L. researched data contributed to discussion and reviewed/edited manuscript. C.K.K. researched data. V.R.R.S. researched data. B.M.C. researched

data. A.V.C. researched data. R.C.G. researched data. R.C.G. researched data V.R.M. researched data A.S.R.S, J.A.C contributed to discussion and reviewed/edited manuscript. M.J.S contributed to discussion and reviewed/edited manuscript J.R.P. contributed to discussion and reviewed/edited manuscript. D.E.C. researched data and contributed to discussion and reviewed/edited manuscript. L.P.M researched data and contributed to discussion and reviewed/edited manuscript E.R.R. wrote the manuscript, contributed to discussion and reviewed/edited manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

1. Farooqui AA, Farooqui T, Panza F, Frisardi V. Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(5):741-62.
2. Ramachandrappa S, Farooqi IS. Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2080-6.
3. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006;444(7121):840-6.
4. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000;404(6778):635-43.
5. Costa MB, Ferreira SR, Franco LJ, Gimeno SG, Iunes M. Dietary patterns in a high-risk population for glucose intolerance. Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. *J Epidemiol.* 2000;10(2):111-7.
6. Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, et al. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell.* 2003;12(1):51-62.
7. Grubisha O, Smith BC, Denu JM. Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. *FEBS J.* 2005;272(18):4607-16.
8. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23(12):2369-80.
9. Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(2):L567-76.
10. Nakazawa H, Chang K, Shinozaki S, Yasukawa T, Ishimaru K, Yasuhara S, et al. iNOS as a Driver of Inflammation and Apoptosis in Mouse Skeletal Muscle after Burn Injury: Possible Involvement of Sirt1 S-Nitrosylation-Mediated Acetylation of p65 NF-kB and p53. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170391.
11. Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E, Sugita M, Koike C, Yasuhara S, et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(2):E386-94.
12. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes.* 2005;54(5):1340-8.

13. Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, et al. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2005;280(14):14203-11.
14. Sugita M, Sugita H, Kim M, Mao J, Yasuda Y, Habiro M, et al. Inducible nitric oxide synthase deficiency ameliorates skeletal muscle insulin resistance but does not alter unexpected lower blood glucose levels after burn injury in C57BL/6 mice. *Metabolism*. 2012;61(1):127-36.
15. Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med*. 2001;7(10):1138-43.
16. Hess DT, Stamler JS. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem*. 2012;287(7):4411-8.
17. Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, et al. Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. *Sci Signal*. 2014;7(351):ra106.
18. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, et al. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes Care*. 2010;33(12):e147-67.
19. Aronson D, Violan MA, Dufresne SD, Zangen D, Fielding RA, Goodyear LJ. Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 1997;99(6):1251-7.
20. Hardin DS, Azzarelli B, Edwards J, Wigglesworth J, Maianu L, Brechtel G, et al. Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: effects on blood flow and differential expression of GLUT 4 in skeletal muscles. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(8):2437-46.
21. Berger M, Hagg S, Ruderman NB. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Interaction of insulin and exercise on glucose uptake. *Biochem J*. 1975;146(1):231-8.
22. Goodyear LJ, Hirshman MF, Horton ES. Exercise-induced translocation of skeletal muscle glucose transporters. *Am J Physiol*. 1991;261(6 Pt 1):E795-9.
23. Holloszy JO, Booth FW. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol*. 1976;38:273-91.

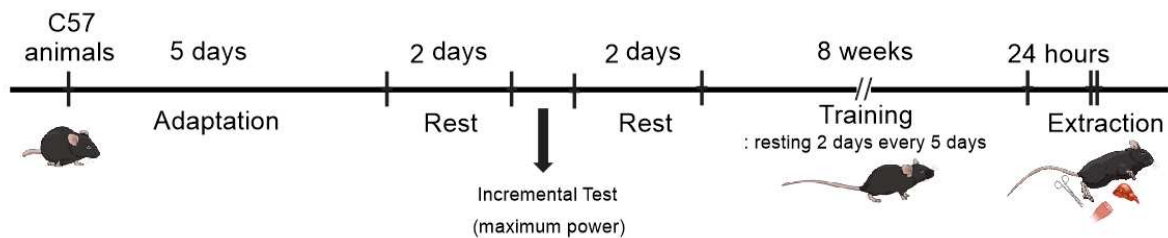
24. Sinitskaya N, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Gournelen S, Pévet P, Challet E. Short day-length increases sucrose consumption and adiposity in rats fed a high-fat diet. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(9):1269-78.
25. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 2007;404(1):1-13.
26. Chalkiadaki A, Guarente L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab*. 2012;16(2):180-8.
27. Liang F, Kume S, Koya D. SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(7):367-73.
28. Yu J, Auwerx J. The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173 Suppl 1:E10-9.
29. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006;127(6):1109-22.
30. Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakci C, Coste A, Lagouge M, et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab*. 2010;11(3):213-9.
31. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-60.
32. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012;15(5):675-90.
33. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*. 2004;432(7020):1027-32.
34. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
35. Muñoz VR, Gaspar RC, Crisol BM, Formigari GP, Sant'Ana MR, Botezelli JD, et al. Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. *J Physiol Sci*. 2018;68(4):493-501.

36. Oh KJ, Han HS, Kim MJ, Koo SH. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep.* 2013;46(12):567-74.
37. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(10):2944-50.
38. Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279(5):E1039-44.

FIGURES

Figure 1.

A. Experimental design



B.

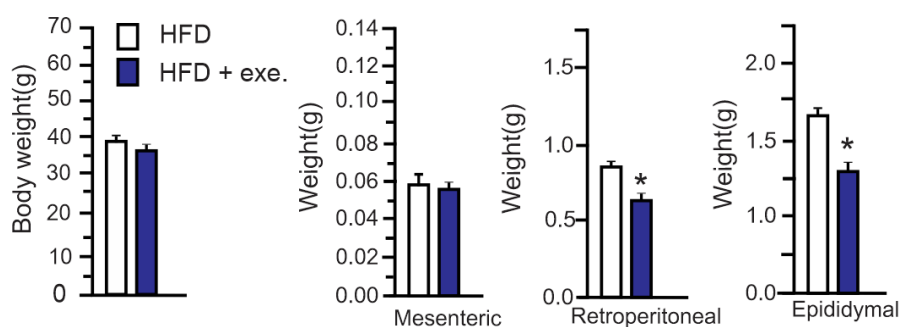
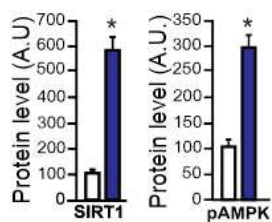
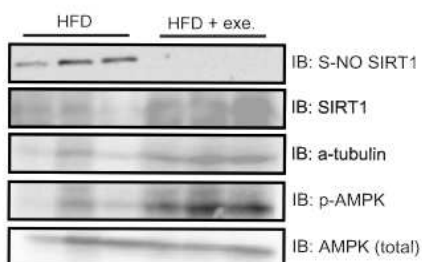
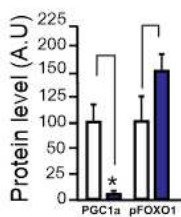
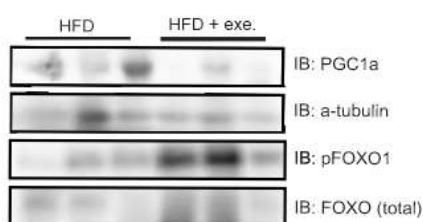


Figure 2. (LIVER)

A.



B.



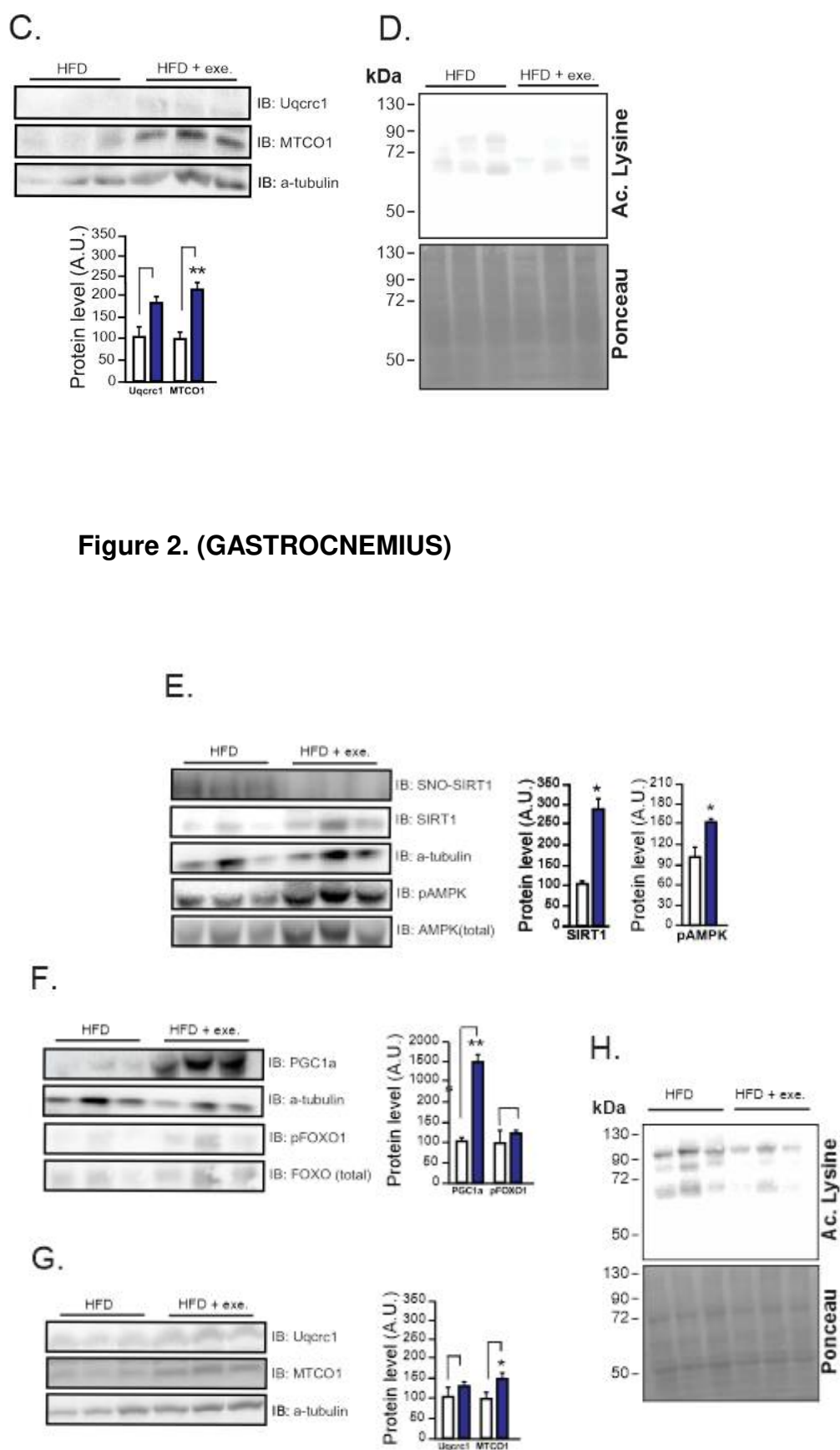


Figure 2. (GASTROCNEMIUS)

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Experimental design (A), total body weight and adipose tissue (B). For these physiological analyses n=10 mice per group.

Figure 2. S-nitrosylation SIRT1 protein in hepatic tissue and skeletal muscle respectively, SIRT1 protein levels and AMPK phosphorylation (A and E), transcription factors (B and F), mitochondrial complexes MTCO1 and Uqcrc1 (C and G) and pattern of global protein acetylation in liver and gastrocnemius (D and H). For these physiological analyses n=5, for the WB analyses n=3-4 mice per group. *p<0.05 vs. HFD and ** p<0.01 vs. HFD.

5. DISCUSSÃO GERAL

A obesidade é um problema de saúde pública e sua prevalência vem aumentando significativamente ao longo dos últimos 30 anos, tornando-se uma epidemia global (WHO, 2005). A obesidade é um importante fator de risco para varias doenças crônicas graves como diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, hipertensão, acidente vascular cerebral, asma e certos tipos de câncer (141). Paralelo a isso muitos são os estudos realizados com o intuito de elucidar os mecanismos moleculares presente na obesidade, a fim de buscar soluções que visam atenuar os problemas advindos dessa doença. Uma proteína que vem ganhando destaque no âmbito científico nos últimos anos é a SIRT1, por possuir características marcantes na melhora da sensibilidade a insulina e biogênese mitocondrial através da desacetilação e ativação PGC-1-alfa (56, 57).

Recentemente alguns estudos tem relatado que a expressão proteica e a atividade desacetilase da SIRT1 no músculo esquelético de camundongos obesos e idosos mostrou-se significativamente reduzida (63, 64). Por outro lado, estudos apontam que o exercício físico é capaz de aumentar a atividade desacetilase da SIRT1, ativando a PGC1 α e consequentemente a biossíntese mitocondrial em mamíferos (63, 64, 68). Porém o mecanismo de como isso acontece ainda é incerto.

Paralelamente o mecanismo da S-nitrosação de proteínas vem ganhando destaque, como uma das principais formas de modificação protéica induzida pelo NO (óxido nítrico) (105). A S-nitrosação ocorre pela ligação covalente do NO com um grupamento tiol (S-H) presente em resíduos de cisteína o qual pode regular uma proteína de forma positiva ou negativamente (95).

Neste estudo demonstramos que a proteína SIRT1 através do mecanismo pos traducional S-nitrosação, teve sua atividade atenuada no tecido hepático e musculo esquelético quando relacionada a obesidade, resultando em um importante comprometimento metabólico. No primeiro estudo ficou evidenciado um forte aumento da acetilação global de proteínas como também na S-nitrosação da SIRT1 em modelo experimental de obesidade apesar do conteúdo proteico de SIRT1 estar reduzido e verificamos que esse fenômeno foi dependente da forma induzida de óxido nítrico (iNOS) adivindo da inflamação ocasionada pela obesidade. Em seguida

constatamos um comprometimento nos fatores transcricionais como FOXO1 e PGC1 α uma vez que a atenuação da proteína SIRT1 é capaz de reduzir suas atividades promovendo uma regulação negativa na biogênese mitocondrial e no metabolismo oxidativo assim como demonstrou(23). Corroborando com Jeon et al; (60) quando mostramos que esse decréscimo no conteúdo proteico de SIRT1 reduziu a atividade de AMPK, proteína esta relacionada ao controle do gasto energético. De maneira interessante camundongos obesos apresentaram uma substancial diminuição nos complexos mitocondriais sugerindo um comprometimento da biogênese mitocondrial assim como evidências apontam que disfunções mitocondriais observadas no músculo de indivíduos obesos são determinantes para o comprometimento do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos, levando à resistência à insulina(35).

A vista disso avaliamos diferentes linhagens (ob/ob e iNOS^{-/-}) para confirmar os achados prévios, verificamos que a obesidade seja ela induzida por dieta ou por alterações genéticas é capaz de promover através da iNOS a S-nitrosação da proteína SIRT1 no fígado e gastrocnêmio levando a fortes implicações na homeostase global.

Estratégias não farmacológicas para conter o avanço da obesidade são de grande interesse, nesse sentido, nosso segundo estudo se propôs a avaliar o efeito de oito semanas de exercício (esteira rolante) em camundongos obesos e interessadamente além de benefícios fisiológicos verificamos melhoras moleculares assim como relatado na literatura por de Moura e colaboradores (116). Os camundongos obesos praticantes do exercício físico obtiveram redução não só da acetilação global das proteínas mas principalmente na S-nitrosação da proteína SIRT1 tanto no fígado quanto no gastrocnêmio culminando em um aumento da atividade da AMPK e nos fatores de transcrição FOXO1 e PGC1 α sugerindo uma melhora na biogênese mitocondrial como comprovado ao analisarmos dois dos complexos mitocondriais responsáveis pela síntese de MTCO1 e Uqcrc1.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo observamos que o aumento dos níveis proteicos da iNOS no tecido hepático e músculo esquelético está diretamente relacionado a redução da atividade da SIRT1 em modelo experimental de obesidade. Observamos que a ação supressora da iNOS sobre a SIRT1 ocorreu através do mecanismo de S-nitrosação. O desfecho desse evento celular em ambos os tecidos é a redução do conteúdo proteico de alguns componentes de diferentes complexos mitocondriais. Observamos que a administração de GSNO foi capaz de reduzir a atividade da SIRT1 no fígado e músculo. Em modelo experimental de obesidade induzida por dieta, animais nocaute para a iNOS apresentaram baixos níveis da S-nitrosação da SIRT1, melhor perfil mitocondrial quando comparado aos animais do grupo controle. Por fim, demonstramos que oito semanas de exercício físico, foi suficiente para reduzir a S-nitrosação da SIRT1 tanto no fígado quanto no gastrocnêmio de animais obesos, bem como promover um aumento substancial na quantidade de marcadores mitocondriais (Uqcrc1 e MTCO1). Coletivamente, esses dados sugerem que a S-nitrosação da SIRT1 na obesidade, está ao menos em parte relacionada ao aumento dos níveis de iNOS no tecido hepático e musculo esquelético e que o exercício físico é um potencial alvo terapêutico para o controle do mecanismo da S-nitrosação da SIRT1.

7. REFERÊNCIAS

1. Mayer J. Obesity. *Postgrad Med*. 1972;51(5):66-9.
2. Baskin ML, Ard J, Franklin F, Allison DB. Prevalence of obesity in the United States. *Obes Rev*. 2005;6(1):5-7.
3. Uauy R, Albala C, Kain J. Obesity trends in Latin America: transiting from under- to overweight. *J Nutr*. 2001;131(3):893S-9S.
4. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-43.
5. Costa MB, Ferreira SR, Franco LJ, Gimeno SG, Iunes M. Dietary patterns in a high-risk population for glucose intolerance. Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. *J Epidemiol*. 2000;10(2):111-7.
6. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.
7. Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C. Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol*. 2009;31(3):333-43.
8. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2008;47(2):729-36.
9. Spassiani NA, Kuk JL. Exercise and the fatty liver. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008;33(4):802-7.
10. Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*. 1992;54:885-909.
11. Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Metabolism. Controlling the glucose factory. *Nature*. 2001;413(6852):125-6.
12. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.
13. Fisher SJ, Kahn CR. Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *J Clin Invest*. 2003;111(4):463-8.
14. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999;103(2):253-9.
15. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*. 1999;48(6):1270-4.

16. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50230-6.
17. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes*. 2002;51(7):2005-11.
18. Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes*. 2006;55 Suppl 2:S9-S15.
19. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 2005;307(5708):384-7.
20. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseane E, Chauvin MA, Morio B, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest*. 2008;118(2):789-800.
21. Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*. 2008;102(4):401-14.
22. Farese RV. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(1):E1-11.
23. Schrauwen P, Hesselink MK. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(6):1412-7.
24. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*. 2004;432(7020):1027-32.
25. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
26. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005;1(6):361-70.
27. Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819(9-10):1088-97.

28. Morris EM, Meers GM, Booth FW, Fritsche KL, Hardin CD, Thyfault JP, et al. PGC-1 α overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced triacylglycerol accumulation and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(8):G979-92.
29. Smith AG, Muscat GE. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(10):2047-63.
30. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(10):2944-50.
31. Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2000;279(5):E1039-44.
32. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32 Suppl 7:S109-19.
33. Webber J. Energy balance in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2003;62(2):539-43.
34. Fruhbeck G. Does a NEAT difference in energy expenditure lead to obesity? *Lancet*. 2005;366(9486):615-6.
35. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(12):3587-93.
36. Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(1):8-14.
37. Ritov VB, Menshikova EV, Azuma K, Wood R, Toledo FG, Goodpaster BH, et al. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2010;298(1):E49-58.
38. Simoneau JA, Colberg SR, Thaete FL, Kelley DE. Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *FASEB J*. 1995;9(2):273-8.
39. Simoneau JA, Kelley DE. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* (1985). 1997;83(1):166-71.

40. Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(14):2051-60.
41. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2004;350(7):664-71.
42. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8466-71.
43. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003;34(3):267-73.
44. Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism: clinical and experimental*. 2000;49(4):467-72.
45. Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, et al. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*. 1997;46(6):983-8.
46. van Loon LJ, Koopman R, Manders R, van der Weegen W, van Kranenburg GP, Keizer HA. Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004;287(3):E558-65.
47. Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, et al. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes*. 1999;48(8):1600-6.
48. Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:325-46.
49. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in

muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):3820-5.

50. Sanchez AM, Candau RB, Bernardi H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(9):1657-71.

51. Morris AA. Mitochondrial respiratory chain disorders and the liver. *Liver*. 1999;19(5):357-68.

52. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics*. 2003;34(3):267-73.

53. Valerio A, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Pisconti A, et al. TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest*. 2006;116(10):2791-8.

54. Nakamura Y, Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Nishida N, Iida K, et al. A huge coronary aneurysm resulting from a coronary artery-to-left ventricle fistula. *Intern Med*. 1998;37(4):366-9.

55. Guarente L, Picard F. Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell*. 2005;120(4):473-82.

56. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J*. 2007;26(7):1913-23.

57. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 2005;434(7029):113-8.

58. Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: Integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta*. 2011.

59. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98(1):115-24.

60. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med*. 2016;48(7):e245.

61. Gariani K, Menzies KJ, Ryu D, Wegner CJ, Wang X, Ropelle ER, et al. Eliciting the mitochondrial unfolded protein response by nicotinamide adenine

dinucleotide repletion reverses fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 2016;63(4):1190-204.

62. Cao Y, Jiang X, Ma H, Wang Y, Xue P, Liu Y. SIRT1 and insulin resistance. *J Diabetes Complications*. 2016;30(1):178-83.

63. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*. 2006;127(6):1109-22.

64. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, da Silva AS, Moraes JC, et al. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(5):323-9.

65. Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem*. 2010;285(44):33959-70.

66. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*. 2009;9(4):327-38.

67. Walker AK, Yang F, Jiang K, Ji JY, Watts JL, Purushotham A, et al. Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. *Genes Dev*. 2010;24(13):1403-17.

68. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-60.

69. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, et al. SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. *Cell metabolism*. 2012;15(5):675-90.

70. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005;1(1):15-25.

71. Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2008;283(29):20015-26.

72. Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakis C, Coste A, Lagouge M, et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab*. 2010;11(3):213-9.

73. Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, Albarado DC, Thomas SC, Xie H, et al. Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(1):E117-26.
74. Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, et al. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell.* 2008;14(5):661-73.
75. Gomes AP, Price NL, Ling AJ, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, et al. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell.* 2013;155(7):1624-38.
76. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* 2011;14(5):612-22.
77. Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* 2008;8(5):347-58.
78. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature.* 2010;464(7293):1313-9.
79. Guarente L. Sirtuins in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2007;72:483-8.
80. Chalkiadaki A, Guarente L. Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(5):287-96.
81. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):225-38.
82. Souza Pauli LS, Ropelle EC, de Souza CT, Cintra DE, da Silva AS, de Almeida Rodrigues B, et al. Exercise training decreases mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 expression and suppresses hepatic gluconeogenesis in obese mice. *J Physiol.* 2014;592(6):1325-40.
83. Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutierrez-Juarez R, Rossetti L, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell metabolism.* 2008;8(4):333-41.

84. Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*. 2007;6(6):759-67.
85. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschop MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(28):9793-8.
86. Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun*. 2010;1:3.
87. Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell*. 2008;135(5):907-18.
88. Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L. SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell*. 2010;142(2):320-32.
89. Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, et al. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(31):21745-54.
90. 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*. 2010;10(1):16-24.
91. Nassir F, Ibdah JA. Sirtuins and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2016;22(46):10084-92.
92. Golabi P, Locklear CT, Austin P, Afdhal S, Byrns M, Gerber L, et al. Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(27):6318-27.
93. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:203-36.
94. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med*. 2003;9(4):160-8.
95. Stamler JS, Simon DI, Jaraki O, Osborne JA, Francis S, Mullins M, et al. S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet

properties on the enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(17):8087-91.

96. Wink DA, Nims RW, Saavedra JE, Utermahlen WE, Jr., Ford PC. The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(14):6604-8.

97. Wink DA, Darbyshire JF, Nims RW, Saavedra JE, Ford PC. 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*. 1993;6(1):23-7.

98. Hogg PJ. Biological regulation through protein disulfide bond cleavage. *Redox Rep*. 2002;7(2):71-7.

99. Liu H, Miller E, van de Water B, Stevens JL. Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca²⁺ increases and cell death. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(21):12858-62.

100. Nedospasov A, Rafikov R, Beda N, Nudler E. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13543-8.

101. Arnette DR, Stamler JS. 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*. 1995;318(2):279-85.

102. Liu Z, Rudd MA, Freedman JE, Loscalzo J. S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284(2):526-34.

103. Hogg N. The kinetics of S-transnitrosation--a reversible second-order reaction. *Anal Biochem*. 1999;272(2):257-62.

104. Martinez-Ruiz A, Lamas S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res*. 2004;62(1):43-52.

105. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(2):150-66.

106. Williams JG, Pappu K, Campbell SL. Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(11):6376-81.

107. Marshall HE, Stamler JS. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry*. 2001;40(6):1688-93.
108. Brune B, Zhou J. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Curr Med Chem*. 2003;10(10):845-55.
109. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*. 2002;297(5584):1186-90.
110. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005;54(4):959-67.
111. Carvalho-Filho MA, Ropelle ER, Pauli RJ, Cintra DE, Tsukumo DM, Silveira LR, 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*. 2009;52(11):2425-34.
112. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, 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*. 2008;586(2):659-71.
113. Kornberg MD, Sen N, Hara MR, Juluri KR, Nguyen JV, Snowman AM, et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1094-100.
114. Katashima CK, Silva VRR, Lenhare L, Marin RM, Carvalheira JBC. iNOS promotes hypothalamic insulin resistance associated with deregulation of energy balance and obesity in rodents. *Sci Rep*. 2017;7(1):9265.
115. Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, et al. Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. *Sci Signal*. 2014;7(351):ra106.
116. de Moura LP, Souza Pauli LS, Cintra DE, de Souza CT, da Silva AS, Marinho R, et al. Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. *Immun Ageing*. 2013;10(1):8.
117. Tsuzuki T, Shinozaki S, Nakamoto H, Kaneki M, Goto S, Shimokado K, et al. Voluntary Exercise Can Ameliorate Insulin Resistance by Reducing iNOS-Mediated S-Nitrosylation of Akt in the Liver in Obese Rats. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132029.

118. Marcinko K, Sikkema SR, Samaan MC, Kemp BE, Fullerton MD, Steinberg GR. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. *Mol Metab.* 2015;4(12):903-15.
119. Botezelli JD, Coope A, Ghezzi AC, Cambri LT, Moura LP, Scariot PP, et al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Sci Rep.* 2016;6:31106.
120. Conti V, Russomanno G, Corbi G, Filippelli A. Exercise training in aging and diseases. *Transl Med UniSa.* 2012;3:74-80.
121. Zierath JR, He L, Gumà A, Odegaard Wahlström E, Klip A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia.* 1996;39(10):1180-9.
122. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, de Pinho RA, Velloso LA, et al. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J Physiol.* 2009;587(Pt 9):2069-76.
123. De Souza CT, Frederico MJ, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, et al. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. *J Physiol.* 2010;588(Pt 12):2239-53.
124. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol.* 2012;227(7):2917-26.
125. Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes.* 2011;60(3):784-96.
126. Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, et al. Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(4):836-41.
127. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(29):12017-22.

128. Koltai E, Szabo Z, Atalay M, Boldogh I, Naito H, Goto S, et al. Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(1):21-8.
129. Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, et al. PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(3):C572-9.
130. Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, Grueter CA, Collins AM, Aouizerat B, et al. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol Cell.* 2011;44(2):177-90.
131. Olson N, van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide.* 2011;25(2):125-37.
132. Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med.* 2009;15(9):391-404.
133. Benhar M, Forrester MT, Stamler JS. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(10):721-32.
134. Radák Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, et al. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J.* 2004;18(6):749-50.
135. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, da Silva AS, De Souza CT, Guadagnini D, et al. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes.* 2013;62(2):466-70.
136. Sinitskaya N, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Gormelen S, Pévet P, Challet E. Short day-length increases sucrose consumption and adiposity in rats fed a high-fat diet. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33(9):1269-78.
137. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68(2):374-8.
138. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

139. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(9):4350-4.
140. Jaffrey SR, Snyder SH. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE*. 2001;2001(86):pl1.
141. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2595-600.

8. ANEXOS



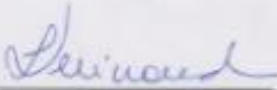

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada CARACTERIZAÇÃO DA S-NITROSAÇÃO DA SIRT1 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E FÍGADO DE ROEDORES OBESOS, registrada com o nº 4261-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle e Luslene Lanhare Remédio, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais; do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 25 de agosto de 2016.

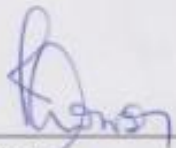
Finalidade:	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	23/05/2016-01/11/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	06/06/2016-01/11/2018
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	100
Peso / idade:	04 semanas / 20g
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lepob/JUnib
No. de animais:	30
Peso / idade:	04 semanas / 25g
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo Camundongos Knockout/ C57BL/6 Ines Ko/JUnib (óxido nítrico)
No. de animais:	40
Peso / idade:	04 semanas / 20g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 25 de agosto de 2016.



Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS
CIDADE UNIVERSITÁRIA DE LIMEIRA



Limeira, 21 de novembro de 2016.

Informação:

Aprovo ad referendum da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio/FCA, o projeto de pesquisa intitulado “Caracterização da S-Nitrosação da SIRT1 no músculo esquelético e fígado de roedores obesos” (nº 2016/02) submetido pela doutoranda Luciene Lenhare com orientação do Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle, por estar em acordo com a legislação vigente que regulamenta as atividades que envolvem organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados.

Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi
Presidente da CIBio/FCA (CQ# 370)
Matrícula 296850