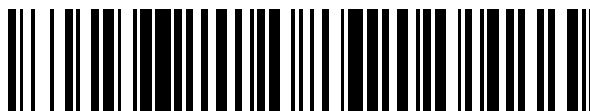


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 032**

51 Int. Cl.:

A61K 31/455	(2006.01) A61P 19/10	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01) A61P 39/00	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01) A61K 31/706	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01)	
A61P 3/06	(2006.01)	
A61P 3/10	(2006.01)	
A61P 25/28	(2006.01)	
A61P 27/10	(2006.01)	
A61P 43/00	(2006.01)	
A61P 19/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/US2014/030920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14146044**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14764546 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 2968306**

54 Título: **Administración de mononucleótido de nicotinamida en el tratamiento de ojo seco**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361801188 P
03.03.2014 US 201461947387 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2023

73 Titular/es:

WASHINGTON UNIVERSITY (100.0%)
One Brookings Drive
Saint Louis, MO 63130, US

72 Inventor/es:

IMAI, SHIN-ICHIRO y
APTE, RAJENDRA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 952 032 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Administración de mononucleótido de nicotinamida en el tratamiento de ojo seco

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/801,188 presentada el 15 de marzo de 2013 y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/947,387 presentada el 3 de marzo de 2014.

10

Introducción

La obesidad relacionada con la edad es un problema relacionado con la salud para el cual se necesitan nuevos tratamientos y métodos para mejorar, mitigar o revertir. La patente de Estados Unidos 8,268,575 de Imai, S., et al. afirma que "los efectores químicos para la biosíntesis de NAD de mamíferos pueden mediar una variedad de efectos antienvjecimiento que incluyen efectos protectores de células β anti-obesidad, neuroprotectores y pancreáticos, así como ser efectivos para tratar cánceres". La patente de Estados Unidos 8,017,634 de Sinclair, D. A., et al. enseña tratar una célula con "un agente que incrementar la enzima NrK". La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0229265 de Milburn, M., et al. analiza el ribósido de nicotinamida y análogos del mismo, incluido su uso en métodos de tratamiento de enfermedades o condiciones, tal como resistencia a la insulina/diabetes, hiperlipidemia y obesidad. El ejemplo 7 de Milburn, M., et al. pretende describir la prueba de efectos neuroprotectores de ribósido de nicotinamida y mononucleótido de nicotinamida en supervivencia de células ganglionares. Ninguna de estas referencias enseña o sugiere administración oral de NMN.

25 Los incrementos relacionados con la edad en los niveles de lípidos en sangre constituyen otro problema relacionado con la salud para el cual se necesitan nuevos tratamientos y métodos para mejorar, mitigar o revertir. La patente de Estados Unidos 7,737,158 de Imai, S., et al. divulga "un proceso para regular la concentración de glucosa en sangre en un mamífero, el proceso que comprende administrar al mamífero una cantidad reguladora de concentración de glucosa en sangre de mononucleótido de nicotinamida (NMN) o una sal o profármaco del mismo". Esta patente no se refiere a la administración de NMN para prevenir incrementos asociados con la edad en lípidos en sangre, en particular no hay divulgación de administración oral de NMN para prevenir incrementos asociados con la edad en lípidos en sangre. La publicación de solicitud de patente PCT WO2009062910 de Inufusa, H. establece que un objetivo es proporcionar composiciones efectivas en la reducción de niveles de triglicéridos en sangre y/o niveles de colesterol para el tratamiento y/o profilaxis de hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y estados de enfermedad inducidos por los mismos tal como arteriosclerosis y obesidad. Sin embargo, esta solicitud no divulga la administración de NMN para controlar los incrementos de lípidos en sangre relacionados con la edad.

40 Las disminuciones relacionadas con la edad en sensibilidad a la insulina constituyen otro problema relacionado con la salud para el cual se necesitan nuevos tratamientos y métodos para mejorar, mitigar o revertir. La patente de Estados Unidos No. 7,737,158 de Imai, S., et al. analiza "procesos para regular la concentración de glucosa en sangre en un mamífero. Los procesos incluyen administrar a un mamífero una cantidad reguladora de concentración de glucosa en sangre de un compuesto ... útil en la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Esta divulgación no enseña la administración de NMN, incluida la administración oral de NMN, para mejorar la sensibilidad a la insulina en el envejecimiento.

45 Las disminuciones o pérdidas relacionadas con la edad en la función de memoria constituyen otro problema relacionado con la salud para el cual se necesitan nuevos tratamientos y métodos para mejorar, mitigar o revertir. En tanto que la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0229265 de Milburn, M., et al. alega, en el ejemplo 7, "efectos neuroprotectores" de NMN, no se presentan datos. Esta aplicación no analiza el uso de NMN para tratar o prevenir la pérdida de memoria. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0002914 de Milbrandt, J., et al. Divulga la administración de un agente que actúa al incrementar la actividad de NAD en neuronas enfermas y/o lesionadas en el tratamiento de enfermedades tal como Alzheimer. No existe ninguna enseñanza explícita sobre la administración de NMN para mejorar la función de memoria bajo condiciones normales de envejecimiento.

55 Las disminuciones o pérdidas relacionadas con la edad en la función ocular constituyen otro problema relacionado con la salud para el cual se necesitan nuevos tratamientos y métodos para mejorar, mitigar o revertir. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0014833 de Milburn, M., et al. Divulga el uso de "moduladores de sirtuina" para tratar el deterioro de visión. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0229265 de Milburn, M., et al. establece que "las condiciones del ojo se pueden tratar o prevenir por, por ejemplo, inyección intraocular, tópica, sistémica de un compuesto modulador de sirtuina, o por inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libera un compuesto modulador de sirtuina. Ninguna de estas publicaciones divulga la administración de NMN para la prevención de la disminución de la función ocular durante el envejecimiento.

65 El ojo seco relacionado con la edad constituye otro problema relacionado con la salud para el cual se necesitan nuevos tratamientos y métodos para mejorar, mitigar o revertir. El ojo seco es uno de los trastornos oculares más prevalentes, particularmente entre los ancianos, y todavía no están disponibles tratamientos fundamentales (Tsubota, K., et al. Cornea.

31 Suppl 1: S1-8, 2012). La disminución de la función secretora de glándula lagrimal puede ser una posible causa de enfermedades de ojo seco asociadas con la edad (Kawashima, M., et al. Biochem Biophys. Res. Commun. 397: 724-8, 2010).

5 El deterioro cognitivo relacionado con la edad constituye otro problema relacionado con la salud para el cual se necesitan nuevos tratamientos y métodos para mejorar, mitigar o revertir. El envejecimiento es un regulador negativo de la proliferación de células progenitoras y madre neurales adultas (NSPC) (Artegiani, B., et al.) En tanto que la proliferación de NSPC disminuye exponencialmente a lo largo de la vida (Artegiani & Calegari, 2012), las NSPC quiescentes se pueden reactivar en el hipocampo murino envejecido por múltiples estímulos ambientales (Decker et al, 2002; Jin et al, 2003; 10 Lugert et al, 2010). El envejecimiento puede reducir los niveles del cofactor esencial nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) en múltiples tejidos periféricos (Yoshino et al, 2011).

La solicitud de patente de Estados Unidos 12/524,718 Milbrandt, J., et al. divulga aplicaciones experimentales de NMN. Esta referencia no menciona la administración de NMN para afectar las NSPC o para la proliferación de oligodendrocitos. 15

Sasaki, Y., et al. J Neurosci. 2006 Aug 16;26(33):8484-91 divulga aplicaciones de NMN. Este artículo no divulga la administración de NMN para afectar las NSPC o promover la proliferación de oligodendrocitos. La solicitud de Estados Unidos US20130059384 A1 de Tilly, J. L., et al. divulga el uso de NMN para mejorar la fertilidad femenina.

20 La disfunción de neuronas fotorreceptoras y la muerte celular es la principal causa de ceguera a lo largo de la vida en humanos. La disfunción de neuronas fotorreceptoras constituye otro problema relacionado con la salud para el cual se necesitan nuevos tratamientos y métodos para mejorar, mitigar o revertir.

La solicitud PCT PCT/US2006/011930 (publicación No. WO2006105403) de Dipp, M., et al. divulgó métodos para tratar el deterioro de visión por administración de un modulador de sirtuina. En el ejemplo 10 de esta referencia, los investigadores probaron los efectos neuroprotectores del mononucleótido de nicotinamida (NMN) en un modelo de lesión de células ganglionares de retina. Sin embargo, las células ganglionares de retina divulgadas en esta solicitud no son fotorreceptores clásicos (bastones y conos). 25

La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US20100047177 de Milbrandt, J., et al. analiza la administración a un mamífero de un agente que incrementa la actividad de NAD en neuronas o células de soporte enfermas y/o lesionadas. La solicitud no especifica la protección o tratamiento de bastones y conos con NMN. 30

La patente de Estados Unidos 7,776,326 de Milbrandt, J., et al. analiza métodos para tratar o prevenir la degradación axonal en enfermedades neuropáticas en mamíferos al administrar un agente que puede incrementar la actividad de sirtuina en células neuronales enfermas/lesionadas. La patente no especifica protección o tratamiento de bastones y conos con NMN. Esta patente no divulga la administración de NMN para mantener las NSPC o promover la proliferación de oligodendrocitos. 35

40 "La estimulación de las rutas biosintéticas de nicotinamida adenina dinucleótido retrasa la degeneración axonal después de la axotomía" J Neurosci. 2006 Aug 16;26(33):8484-8491 de Sasaki, Y., et al. Analiza la adición de NMN a las neuronas cultivadas. Este artículo no divulga la administración de NMN a células de retina *in vivo*.

La patente china CN 101601679 B "aplicación de mononucleótido de nicotinamida" divulga aplicaciones de NMN para prevención de derrame cerebral. 45

La solicitud PCT PCT/IB2012/001146 de Alvarez, C. C., et al. divulga el tratamiento de una disfunción mitocondrial con un compuesto que incrementa nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) intracelular en una cantidad suficiente para activar SIRT1 o SIRT3. La solicitud no divulga la administración de Nmn a células neuronales. Esta referencia no menciona las NSPC. 50

La patente de Estados Unidos 7,737,158 de Imai, S., et al. divulga procesos para regular la concentración de glucosa en sangre por administración de NMN. La patente no enseña la administración de NMN a neuronas fotorreceptoras tipo bastón/cono. Esta referencia no analiza la administración de NMN para tratar las NSPC o para enfermedades relacionadas con la edad o enfermedades neurodegenerativas no relacionadas con los niveles de glucosa. 55

Revollo, J.R., et al. Cell metabolism 6, 363-375 (2007), Ramsey, K.M., et al. Aging Cell. 2008 Jan;7(1):78-88, y Yoshino, J., et al. Cell Metab. 2011 Oct 5;14(4):528-36 no divulgan la administración de NMN para tratar la degeneración de fotorreceptores, degeneración de retina o degeneración macular. Exp Eye Res. 2013 Mar;108:76-83 de Bai, S., et al. no divulga el direccionamiento de neuronas fotorreceptoras tipo bastón/cono con NMN. Estos artículos no analizan las NSPC. 60 WO 2006/127987 describe el tratamiento de trastornos oculares con moduladores de sirtuina.

Sumario

La presente invención proporciona un mononucleótido de nicotinamida (NMN) o una sal del mismo para uso en el tratamiento o prevención del ojo seco en un sujeto. La presente invención se define adicionalmente en las reivindicaciones anexas.

5 Más en general, los presentes inventores describen la administración de mononucleótido de nicotinamida (NMN), como se ilustra en (figura 1), a un sujeto tal como un vertebrado, incluido un humano u otro mamífero, un ave, un reptil, un pez u otro organismo acuático.

10 Además, también se divulgan en diferentes realizaciones composiciones que comprenden NMN. En diferentes configuraciones, estas composiciones pueden comprender además uno o más excipientes. Estas composiciones se pueden usar para la administración de NMN para el tratamiento, mejora, mitigación, desaceleración, detención, prevención y/o reversión de cambios degenerativos asociados con la edad como se reivindica.

15 En algunas realizaciones, cualquiera de las dosis de las presentes enseñanzas de mononucleótido de nicotinamida (NMN) y/o una sal del mismo se puede usar para tratar cualquiera de las enfermedades de las presentes enseñanzas.

20 En diferentes realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen una composición farmacéuticamente aceptable que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en mononucleótido de nicotinamida (NMN) y/o una sal del mismo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En diferentes configuraciones, una composición farmacéuticamente aceptable puede, comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una formulación de dosis individual. En algunas configuraciones, una formulación de dosis individual puede ser una formulación de liberación sostenida.

25 En diferentes configuraciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede ser una formulación que incluye una píldora, una tableta, un comprimido oblongo, una cápsula, una tableta masticable, una tableta de disolución rápida, un polvo, una tableta efervescente, una cápsula de gelatina dura, una cápsula de gelatina blanda, un líquido no acuoso, un líquido acuoso, un gránulo, una cápsula, una suspensión, una solución, una emulsión, un jarabe, una solución o suspensión acuosa esterilizada, una solución o suspensión no acuosa, una formulación liofilizada o un supositorio.

30 En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede ser una formulación de dosis individual. En diferentes realizaciones, una formulación de dosis individual puede comprender un revestimiento entérico. En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en NMN y/o una sal del mismo en una cantidad de aproximadamente 100 mg, de 100 mg a 2000 mg, aproximadamente 2000 mg o más. En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en NMN y/o una sal del mismo en una cantidad de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1900 mg, aproximadamente 2000 mg o más. En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en NMN y/o una sal del mismo en una cantidad de 50-150mg, 151-250 mg, 251-350 mg, 351-450 mg, 451-550 mg, 561-650 mg, 651-750 mg, 751-860 mg, 861-950 mg, 951-1050 mg, 1051-1150 mg, 1151-1250 mg, 1251-1350 mg, 1351-1450 mg, 1451-1550 mg, 1551-1650 mg, 1651-1750 mg, 1751-1850 mg, 1851-1950 mg, 1951-2000 mg o más. En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en NMN y/o una sal del mismo en una cantidad de al menos 0,5 mg hasta aproximadamente 6800 mg, tal como, sin limitación, 0,5 mg, aproximadamente 0,5 mg, 1mg, aproximadamente 1mg, 5 mg, aproximadamente 5 mg, 10mg, aproximadamente 10 mg, 20 mg, aproximadamente 20 mg, 30 mg, aproximadamente 30 mg, 40 mg, aproximadamente 40 mg, 50 mg, aproximadamente 50 mg, 60 mg, aproximadamente 60 mg, 70 mg, aproximadamente 70 mg, 80 mg, aproximadamente 80 mg, 90 mg, aproximadamente 90 mg, 100 mg, aproximadamente 100 mg, 150 mg, aproximadamente 150 mg, 200 mg, aproximadamente 200 mg, 250 mg, aproximadamente 250 mg, 300 mg, aproximadamente 300 mg, 400 mg, aproximadamente 400 mg, 450 mg, aproximadamente 450 mg, 500 mg, aproximadamente 500 mg, 600 mg, aproximadamente 600 mg, 680 mg, aproximadamente 680 mg, 700 mg, aproximadamente 700 mg, 800 mg, aproximadamente 800 mg, 900 mg, aproximadamente 900 mg, 1000 mg, aproximadamente 1000 mg, 1100 mg, aproximadamente 1100 mg, 1130 mg, aproximadamente 1130 mg, 1200 mg, aproximadamente 1200 mg, 1300 mg, aproximadamente 1300 mg, 1350 mg, aproximadamente 1350 mg, 1360 mg, aproximadamente 1360 mg, 1400 mg, aproximadamente 1400 mg, 1500 mg, aproximadamente 1500 mg, 1600 mg, aproximadamente 1600 mg, 1700 mg, aproximadamente 1700 mg, 1800 mg, aproximadamente 1800 mg, 1900 mg, aproximadamente 1900 mg, 2000 mg, aproximadamente 2000 mg, 2040 mg, aproximadamente 2040 mg, 2100 mg, aproximadamente 2100 mg, 2200 mg, aproximadamente 2200 mg, 2250 mg, aproximadamente 2250 mg, 2300 mg, aproximadamente 2300 mg, 2400 mg, aproximadamente 2400 mg, 2500 mg, aproximadamente 2500 mg, 2600 mg, aproximadamente 2600 mg, 2700 mg, aproximadamente 2700 mg, 2800 mg, aproximadamente 2800 mg, 2900 mg, aproximadamente 2900 mg, 3000 mg, aproximadamente 3000 mg, 3100 mg, aproximadamente 3100 mg, 3200 mg, aproximadamente 3200 mg, 3300 mg, aproximadamente 3300 mg, 3400 mg, aproximadamente 3400 mg, 3500 mg,

aproximadamente 3500 mg, 3600 mg, aproximadamente 3600 mg, 4000 mg, aproximadamente 4000 mg, 4500 mg, aproximadamente 4500 mg, 5000 mg, aproximadamente 5000 mg, 5500 mg, aproximadamente 5500 mg, 6000 mg, aproximadamente 6000 mg, 6500 mg, aproximadamente 6500 mg, 6800 mg o aproximadamente 6800 mg.

En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender un producto alimenticio. En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender una composición adecuada para administración oral, administración sublingual, administración parenteral, administración por inyección, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección intraocular, aplicación ocular directa (gota oftálmica) o una combinación de estas.

En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender además al menos un excipiente. En algunas realizaciones, el al menos un excipiente puede comprender un agente volumétrico, un agente de formación de tabletas, un agente de disolución, un agente humectante, un lubricante, un colorante, un saborizante, un desintegrante, un revestimiento, un aglutinante, un antioxidante, un agente de enmascaramiento de sabor, un edulcorante o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un agente volumétrico puede comprender manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas se puede formular como una cápsula, tableta, píldora u oblea que se desintegra de manera oral. En alguna realización, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas se puede formular como un líquido, jarabe o aerosol.

En alguna realización, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender además al menos una vitamina o nutriente. En algunas realizaciones, una vitamina o nutriente puede ser vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, niacina, vitamina B6, ácido fólico, vitamina B12, ácido pantoténico, biotina, magnesio, zinc, cobre, selenio, cromo, ácido alfa lipoico, b coenzima Q-10, luteína, licopeno o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una vitamina o nutriente puede ser una cantidad que comprende 150 mg a aproximadamente 750 mg de vitamina C, de aproximadamente 315 UI a aproximadamente 1800 UI de vitamina D3, de aproximadamente 75 UI a aproximadamente 150 UI de vitamina E, de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 35 mg de vitamina B1, de aproximadamente 1,7 mg a aproximadamente 5,1 mg de vitamina B2, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg de niacina, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg de vitamina B6, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 2,5 mg de ácido fólico, de aproximadamente 35 mcg a aproximadamente 105 mcg de vitamina B12, de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 7,5 mg de ácido pantoténico, de aproximadamente 50 mcg a aproximadamente 450 mcg de biotina, de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 55 mg de magnesio, de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 55 mg de zinc, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 mg de cobre, de aproximadamente 75 mcg a aproximadamente 175 mcg de selenio, de aproximadamente 75 mcg a aproximadamente 225 mcg de cromo, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg de ácido alfa lipoico, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg de coenzima Q-10, de aproximadamente 350 mcg a aproximadamente 3 mg de luteína, de aproximadamente 100 mcg a aproximadamente 750 mcg de licopeno, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, una vitamina o nutriente puede ser aproximadamente 500 mg de ácido ascórbico, aproximadamente 400 UI de colecalciferol, aproximadamente 125 UI de succinato de d-alfa tocoferol, aproximadamente 35 mg de mononitrato de tiamina, aproximadamente 5,1 mg de riboflavina, aproximadamente 50 mg de niacinamida, aproximadamente 50 mg de piridoxina HCl, aproximadamente 2,5 mg de ácido fólico, aproximadamente 105 mcg de cianocobalamina, aproximadamente 7,5 mg de pantotenato de d-calcio, aproximadamente 75 mcg de d-biotina, aproximadamente 55 mg de malato de dimagnesio, aproximadamente 55 mg de quelato de bisglicinato de zinc, aproximadamente 1,5 mg de quelato de aminoácido de cobre, aproximadamente 175 mcg de quelato de aminoácido de selenio, aproximadamente 225 mcg de quelato de aminoácido de cromo, aproximadamente 10 mg de ácido alfa lipoico, aproximadamente 50 mg de coenzima Q-10, aproximadamente 400 mcg de luteína, aproximadamente 125 mcg de licopeno, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, un excipiente de las presentes enseñanzas puede ser fosfato dicálcico, celulosa microcristalina, ácido esteárico, croscarmelosa de sodio, trisilicato de magnesio, estearato de magnesio, hidroxipropilmetilcelulosa, hipromelosa, dióxido de titanio, citrato tripotásico, alcohol polivinílico, sílice pirógena, ácido cítrico, polietilenglicol, talco o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un excipiente de las presentes enseñanzas puede ser aproximadamente 100 mg a aproximadamente 300 mg de fosfato dicálcico, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg de celulosa microcristalina, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 30 mg de ácido esteárico, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 30 mg de croscarmelosa de sodio, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 15 mg de trisilicato de magnesio, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 15 mg de estearato de magnesio, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 15 mg de hidroxipropilmetilcelulosa, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, un excipiente de las presentes enseñanzas puede ser aproximadamente 200 mg de fosfato dicálcico, aproximadamente 50 mg de celulosa microcristalina, aproximadamente 20 mg de ácido esteárico, aproximadamente 20 mg de croscarmelosa de sodio, aproximadamente 10 mg de trisilicato de magnesio,

aproximadamente 10 mg de estearato de magnesio, aproximadamente 10 mg de hidroxipropilmetilcelulosa o una combinación de los mismos.

5 En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede ser una formulación de liberación sostenida de mononucleótido de nicotinamida para administración oral. En algunas realizaciones, una formulación de liberación sostenida de mononucleótido de nicotinamida para administración oral puede comprender mononucleótido de nicotinamida como un principio activo que se libera de la formulación a lo largo de un perfil de liberación predeterminado, donde la formulación comprende un componente de liberación prolongada y un componente de liberación inmediata, donde el componente de liberación prolongada se contiene en al menos una población de perlas y libera mononucleótido de nicotinamida de manera continua y cada población de perlas se reviste con su propio revestimiento de control de liberación y se caracteriza por su propia velocidad de liberación.

15 En algunas realizaciones, un componente de liberación prolongada puede liberar el mononucleótido de nicotinamida *in vivo* de una manera continua. En algunas realizaciones, un componente de liberación prolongada puede liberar el mononucleótido de nicotinamida *in vivo* de manera continua y 80 % del mononucleótido de nicotinamida se puede liberar *in vivo* en un período de tiempo seleccionado de no más de 24 horas, no más de 16 horas, no más de 12 horas, no más de 8 horas o no más de 4 horas. En algunas realizaciones, un componente de liberación inmediata de las presentes enseñanzas puede ser una composición de liberación inmediata mejorada (EIR) que comprende un agente de formación de complejos, un agente intensificador o una combinación. En algunas realizaciones, una composición de EIR puede exhibir un perfil de liberación *in vitro* de modo que 80 % del principio activo se disuelve en no más de 30 min. En algunas realizaciones, una composición de EIR puede exhibir un perfil de liberación *in vitro* seleccionado de un grupo que consiste en: a) una disolución de al menos 50 % del compuesto activo en no más de 10 minutos, b) una disolución de al menos 70 % del compuesto activo en no más de 10 minutos, c) una disolución de al menos 25 % del compuesto activo en no más de 5 minutos, d) una disolución de al menos 40 % del compuesto activo en no más de 5 minutos o e) una disolución de al menos 55 % del compuesto activo en no más de 5 minutos.

25 En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede incluir un agente de formación de complejos. En algunas realizaciones, un agente de formación de complejos puede ser hidroxipropil-beta-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, gamma-ciclodextrina, alfa-ciclodextrina o una combinación de las mismas.

30 En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede incluir un agente intensificador. En algunas realizaciones, un agente intensificador puede ser un agente intensificador de solubilidad, un agente intensificador de disolución, un agente intensificador de absorción, un agente intensificador de penetración, un agente tensioactivo, un estabilizador, un inhibidor enzimático, un inhibidor de p-glicoproteína, un inhibidor de proteína de resistencia a múltiples fármacos o una combinación de los mismos.

35 En algunas realizaciones, un agente intensificador puede ser vitamina E TPGS, ácido glutámico, glicina, sorbitol, manosa, amilosa, maltosa, manitol, lactosa, sacarosa, glucosa, xilitosa, dextrinas, oxiestearato de glicerolpolietilenglicol, palmitoestearato de glicerilo PEG-32, laurilsulfato de sodio, monooleato de sorbitán de polioxietileno, alcohol bencílico, monolaurato de sorbitán, poloxámero 407, PEG3350, PVP K25, ácido oleico, monooleato de glicerilo, benzoato de sodio, alcohol cetílico, estearato de sacarosa, crospovidona, glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa de sodio, carboximetilcelulosa, almidón, almidón pregelatinizado, HPMC, hidroxipropilcelulosa sustituida, bicarbonato de sodio de celulosa microcristalina, citrato de calcio, docusato de sodio, mentol o cualquier combinación de los mismos.

40 En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede incluir al menos una parte del principio activo en forma de partículas micronizadas. En algunas realizaciones, una partícula micronizada puede tener un tamaño promedio de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 100 µm.

45 En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede incluir una cantidad específica de cada componente determinada de acuerdo con el propósito de administración y el perfil de liberación predeterminado, y la cantidad total de NMN en la formulación es de 0,5 a 3000 mg.

50 En algunas realizaciones, una población de perlas de las presentes enseñanzas puede comprender un portador inerte, NMN, un intensificador opcional, un revestimiento de control de liberación que comprende un material de revestimiento, un formador de poros, un excipiente o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un portador inerte de las presentes enseñanzas puede ser una esfera de celulosa, dióxido de silicio, almidón, una esfera de azúcar o una combinación de los mismos.

55 En algunas realizaciones, un intensificador puede ser un intensificador de solubilidad, un intensificador de disolución, un intensificador de permeabilidad, un estabilizador, un agente de formación de complejos, un inhibidor enzimático, un inhibidor de p-glicoproteína, un inhibidor de proteína de resistencia a múltiples fármacos o una combinación de los mismos.

60 En algunas realizaciones, un material de revestimiento de las presentes enseñanzas puede ser etilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, alcohol polivinílico, poliacrilatos, polimetacrilatos y copolímeros de los mismos; y/o un formador de poros se selecciona de un grupo que

consiste en glucosa, fructosa, manitol, manosa, galactosa, sorbitol, pululano, dextrano, polímeros hidrófilos solubles en agua, hidroxialquilcelulosas, carboxialquilcelulosas, hidroxipropilmetilcelulosa, éteres de celulosa, resinas acrílicas, polivinilpirrolidona, polivinilpirrolidona reticulada, óxido de polietileno, Carbowaxes, Carbopol, dioles, polioles, alcoholes polihídricos, polialquilenglicoles, polietilenglicoles, polipropilenglicoles o polímeros de bloque de los mismos, poliglicoles, poli(a-w)alquilendioles; compuestos inorgánicos seleccionados de un grupo que consiste en sales de metales alcalinos y sales de metales alcalinotérreos, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, una cantidad de una población de perlas individual se determina de acuerdo con un perfil de liberación predeterminado. En algunas realizaciones, un perfil de liberación predeterminado puede comprender una velocidad de liberación sostenida después de una liberación inmediata inicial. En algunas realizaciones, una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede ser adecuada para la administración oral una vez al día. En algunas realizaciones, una población de perlas puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en perlas de NMN de liberación prolongada que comprenden adicionalmente un componente de liberación inmediata revestido en la parte superior del revestimiento de control de liberación. En algunas realizaciones, una formulación de una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender un intensificador contenido en una capa separada del revestimiento de control de liberación. En algunas realizaciones, una formulación de una composición farmacéuticamente aceptable de las presentes enseñanzas puede comprender al menos un agente intensificador donde el agente intensificador se incorpora en la formulación en forma de un polvo o de una población de perlas que se caracterizan opcionalmente por una velocidad de liberación controlada, y donde el agente intensificador se separa del principio activo.

En diferentes configuraciones, una composición de las presentes enseñanzas puede comprender mononucleótido de nicotinamida (NMN) o una sal farmacéutica de NMN. En diferentes configuraciones, una sal puede ser una sal farmacéuticamente aceptable; es decir, una sal preparada a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluidos ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Los ejemplos no limitantes de ácidos no tóxicos adecuados incluyen ácidos inorgánicos y orgánicos de residuos básicos tal como aminas, por ejemplo, ácido acético, benenosulfónico, benzoico, anforsulfónico, cítrico, etenosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, bábaro, p-toluenosulfónico y similares; y sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tal como ácidos carboxílicos, por ejemplo, sales de metales alcalinos y alcalinotérreos derivadas de las siguientes bases: hidruro de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio, hidróxido de zinc, amoníaco, trimetilamoniaco, trietilamoniaco, etilendiamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N"-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, dietanolamina, procaina, n-bencilfenetilamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilamonio y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar al hacer reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, página 1418.

En algunas realizaciones, NMN se puede dispersar en un portador farmacéuticamente aceptable antes de la administración a un sujeto. En diferentes realizaciones, un portador, también conocido en la técnica como excipiente, vehículo, auxiliar, adyuvante o diluyente, puede ser una sustancia que es farmacéuticamente inerte, puede conferir una consistencia o forma adecuada a la composición y no disminuye la eficacia del NMN. Se puede considerar que un portador es "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" si no conduce a reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones inconvenientes farmacéuticamente inaceptables cuando se administra a un sujeto, incluido un sujeto mamífero.

La selección de un portador farmacéuticamente aceptable también puede ser, en parte, una función de la vía de administración. Por ejemplo, las vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a, administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, subcutánea, rectal, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraperitoneal o intraesternal), tópica (nasal, transdérmica, ocular tal como gotas oftálmicas, intraocular), intravesical, intratecal, enteral, pulmonar, intralinfática, intracavital, vaginal, transuretral, intradérmica, aural, intramamaria, bucal, ortotópica, intratraqueal, intralesional, percutánea, endoscópica, transmucosa, sublingual e intestinal.

Los portadores farmacéuticamente aceptables para uso en las presentes enseñanzas se pueden seleccionar con base en varios factores: el compuesto particular usado y su concentración, estabilidad y biodisponibilidad propuesta; el sujeto, su edad, tamaño y condición general; y la vía de administración. Los solventes polares no acuosos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcoholes (por ejemplo, α -glicerol formal, β -glicerol formal, 1,3-butilenglicol, alcoholes alifáticos o aromáticos que tienen 2-30 átomos de carbono tal como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, t-butanol, hexanol, octanol, hidrato de amileno, alcohol bencílico, glicerina (glicerol), glicol, hexilenglicol, alcohol tetrahidrofurfurílico, alcohol laurílico, alcohol cetílico o alcohol estearílico, ésteres de ácidos grasos de alcoholes grasos tal como polialquilenglicoles (por ejemplo, polipropilenglicol, polietilenglicol), sorbitán, sacarosa y colesterol); amidas (por ejemplo, dimetilacetamida (DMA), benzoato de bencilo DMA, dimetilformamida, N-(β -hidroxietil)-lactamida, N,N-dimetilacetamida amidas, 2-pirrolidinona, 1-metil-2-pirrolidinona o polivinilpirrolidona); ésteres (por ejemplo, 1-metil-2-pirrolidinona, 2-pirrolidinona, ésteres de acetato tal como monoacetina, diacetina y triacetina, ésteres alifáticos o aromáticos tal como caprilato u octanoato de etilo, oleato de alquilo, benzoato de bencilo, acetato de bencilo,

dimetilsulfóxido (DMSO), ésteres de glicerina tal como citratos o tartratos de mono, di o triglicerilo, benzoato de etilo, acetato de etilo, carbonato de etilo, lactato de etilo, oleato de etilo, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ésteres de PEG derivados de ácidos grasos, monoestearato de glicerilo, ésteres de glicéridos tal como mono, di, tri-glicéridos, ésteres de ácidos grasos tal como miristato de isopropilo, ésteres de PEG derivados de ácidos grasos tal como PEG-hidroxiolateo y PEG-hidroxiestearato, N-metilpirrolidinona, pluronic 60, poliésteres oleicos de polioxietilensorbitol tal como poli(etoxilado) 30-60 sorbitol poli(oleato)2-4, poli(oxietileno)15-20 monooleato, poli(oxietileno)15-20 mono 12-hidroxiestearato y poli(oxietileno)15-20 mono ricinoleato, ésteres de polioxietileno sorbitán tal como monooleato de polioxietilen-sorbitán, monopalmitato de polioxietilen-sorbitán, monolaurato de polioxietilen-sorbitán, monoestearato de polioxietilen-sorbitán y Polysorbate^{MR} 20, 40, 60 u 80 de ICI Americas, Wilmington, Del., polivinilpirrolidona, ésteres de ácidos grasos modificados con alquilenoxi tal como aceite de ricino polioxil 40 hidrogenado y aceites de ricino polioxietilados (por ejemplo, solución Cremophor^{MR} EL o solución Cremophor^{MR} RH 40), ésteres de ácidos grasos sacáridos (es decir, el producto de condensación de un monosacárido (por ejemplo, pentosas tal como ribosa, ribulosa, arabinosa, xilosa, lixosa y xilulosa, hexosas tal como glucosa, fructosa, galactosa, manosa y sorbosa, triosas, tetrasas, heptosas y octosas), disacárido (por ejemplo, sacarosa, maltosa, lactosa y trehalosa) u oligosacárido o mezcla de los mismos con un ácido graso de C4-C22 (por ejemplo, ácidos grasos saturados tal como ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico, y ácidos grasos insaturados tal como ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido eláidico, ácido erúico y ácido linoleico)), o ésteres de esteroides); éteres alquílicos, arílicos o cíclicos que tienen 2-30 átomos de carbono (por ejemplo, éter dietílico, tetrahidrofurano, dimetilisorbida, éter monoetilico de dietilenglicol); glicofurol (éter de polietilenglicol de alcohol tetrahidrofurfurílico); cetonas que tienen 3-30 átomos de carbono (por ejemplo, acetona, metilacetona, metilisobutilcetona); hidrocarburos alifáticos, cicloalifáticos o aromáticos que tienen 4-30 átomos de carbono (por ejemplo, benceno, ciclohexano, diclorometano, dioxolanos, hexano, n-decano, n-dodecano, n-hexano, sulfolano, tetrametilsulfona, tetrametilsulfóxido, tolueno, dimetilsulfóxido (DMSO) o tetrametilenosulfóxido); aceites de origen mineral, vegetal, animal, esencial o sintético (por ejemplo, aceites minerales tal como hidrocarburos alifáticos o basado en cera, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos mixtos alifáticos y basados aromáticos y aceite de parafina refinado, aceites vegetales tal como aceite de linaza, vernicia, cártamo, soja, ricino, semilla de algodón, cacahuete, colza, coco, palma, oliva, maíz, germen de maíz, sésamo, péscico y cacahuete y glicéridos tal como mono, di o triglicéridos, aceites animales tal como aceite de pescado, marino, esperma, hígado de bacalao, haliver, escualeno, escualano y de hígado de tiburón, aceites oleicos, y aceite de ricino polioxietilado); haluros de alquilo o arilo que tienen 1-30 átomos de carbono y opcionalmente más de un sustituyente halógeno; cloruro de metileno; monoetanolamina; bencina de petróleo; trolamina; ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (por ejemplo, ácido alfa-linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico); éster de poliglicol de ácido 12-hidroxiesteárico y polietilenglicol (Solutol^{MR} HS-15, de BASF, Ludwigshafen, Alemania); polioxietilenglicerol; laurato de sodio; oleato de sodio; o monooleato de sorbitán.

Otros solventes farmacéuticamente aceptables para uso en las presentes enseñanzas se conocen bien por aquellos expertos en la técnica, y se identifican en The Chemotherapy Source Book (Williams & Wilkens Publishing), The Handbook of Pharmaceutical Excipients, (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., y The Pharmaceutical Society of Great Britain, London, England, 1968), Modern Pharmaceuticals, (G. Banker et al., eds., 3d ed.) (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1995), The Pharmacological Basis of Therapeutics, (Goodman & Gilman, McGraw Hill Publishing), Pharmaceutical Dosage Forms, (H. Lieberman et al., eds.) (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1980), Remington's Pharmaceutical Sciences (A. Gennaro, ed., 19th ed.) (Mack Publishing, Easton, Pa., 1995), The United States Pharmacopeia 24, The National Formulary 19, (National Publishing, Philadelphia, Pa., 2000), A. J. Spiegel et al., y Use of Nonaqueous Solvents in Parenteral Products, Journal Of Pharmaceutical Sciences, Vol. 52, No. 10, páginas 917-927 (1963).

Los siguientes métodos se describen en general en la presente, pero no se reivindican en la presente. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar, mejorar, mitigar, desacelerar, detener, prevenir o revertir la obesidad asociada con la edad en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar, mejorar, mitigar, desacelerar, detener, prevenir o revertir incrementos asociados con la edad en los niveles de lípidos en sangre en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar, mejorar, mitigar, desacelerar, detener, prevenir o revertir la pérdida de sensibilidad a la insulina asociada con la edad en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar, mejorar, mitigar, desacelerar, detener, prevenir o revertir el deterioro de la función de memoria asociado con la edad en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar, mejorar, mitigar, desacelerar, detener, prevenir o revertir la disminución asociada con la edad en la función ocular en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar, mejorar, mitigar, desacelerar, detener, prevenir o revertir la degeneración de retina asociada con la edad en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar, mejorar, mitigar, desacelerar, detener, prevenir o revertir el ojo seco. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar, mejorar, mitigar, desacelerar, detener, prevenir o revertir el ojo seco asociado con la edad.

En diferentes realizaciones, cada uno de estos métodos independientemente puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de mononucleótido de nicotinamida (NMN). En algunas realizaciones, NMN se puede administrar a una velocidad de dosis de aproximadamente 100 mg por día, de 100 mg por día a 2000 mg por día, o aproximadamente 2000 mg por día. En algunas realizaciones, NMN se puede administrar a una velocidad de dosis de 0,5 mg, aproximadamente 0,5 mg, 1 mg, aproximadamente 1 mg, 5 mg,

aproximadamente 5 mg, 10 mg, aproximadamente 10 mg, 20 mg, aproximadamente 20 mg, 30 mg, aproximadamente 30 mg, 40 mg, aproximadamente 40 mg, 50 mg, aproximadamente 50 mg, 60 mg, aproximadamente 60 mg, 70 mg, aproximadamente 70 mg, 80 mg, aproximadamente 80 mg, 90 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg por día, 100 mg por día, 150 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg por día, 200 mg por día, 500 mg por día, 500 mg por día, aproximadamente 600 mg por día, 600 mg por día, aproximadamente 700 mg por día, 700 mg por día, aproximadamente 800 mg por día, 800 mg por día, aproximadamente 900 mg por día, 900 mg por día, aproximadamente 1000 mg por día, 1000 mg por día, aproximadamente 1100 mg por día, 1100 mg por día, aproximadamente 1200 mg por día, 1200 mg por día, aproximadamente 1300 mg por día, 1300 mg por día, 1350 mg, aproximadamente 1350 mg, aproximadamente 1400 mg por día, 1400 mg por día, aproximadamente 1500 mg por día, 1500 mg por día, aproximadamente 1600 mg por día, 1600 mg por día, aproximadamente 1700 mg por día, 1700 mg por día, aproximadamente 1800 mg por día, 1800 mg por día, aproximadamente 1900 mg por día, 1900 mg por día, aproximadamente 2000 mg por día, 2000 mg por día, 2040 mg, aproximadamente 2040 mg, 2250 mg, aproximadamente 2250 mg, 2260 mg, aproximadamente 2260 mg, 2700 mg, aproximadamente 2700 mg, 2720 mg, aproximadamente 2720 mg, 3400 mg, aproximadamente 3400 mg, 3390 mg, aproximadamente 3390 mg, 3400 mg, aproximadamente 3400 mg, 3600 mg, aproximadamente 3600 mg, 4080 mg, aproximadamente 4080 mg, 4500 mg, aproximadamente 4500 mg, 4520 mg, aproximadamente 4520 mg, 5440 mg, aproximadamente 5440 mg, 5650 mg, aproximadamente 5650 mg, 6800 mg, aproximadamente 6800 mg o una alternancia o combinación de lo mismo. En algunas realizaciones, NMN se puede administrar a una velocidad de dosis de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día, de 100 mg/kg de peso corporal/día a 500 mg/kg de peso corporal/día, o aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal/día. En algunas realizaciones, NMN se puede administrar a una velocidad de dosis de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día, de 100 mg/kg de peso corporal/día a 300 mg/kg de peso corporal/día, o aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal/día. En algunas realizaciones, estos métodos pueden comprender administrar a un sujeto cualquiera de las composiciones farmacéuticamente aceptables de las presentes enseñanzas. En algunas realizaciones, estos métodos pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en administrar una formulación una vez al día. En algunas realizaciones, estos métodos pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en administrar una formulación dos veces al día.

Los siguientes métodos se describen en general en la presente, pero no se reivindican en la presente. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para incrementar los niveles de NAD⁺ en un sujeto a través de la administración de NMN. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar defectos asociados con la edad en la funcionalidad de células progenitoras/madre neurales (NSPC) en un sujeto a través de la administración de NMN. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir la disminución asociada con la edad en una población de NSPC en un sujeto a través de la administración de NMN. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para mantener al menos una NSPC en un sujeto a través de la administración de NMN. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para mejorar la biosíntesis de NAD en un sujeto a través de la administración de NMN. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para promover la proliferación de NSPC en un sujeto, en los cuales los métodos comprenden la administración de NMN al sujeto. Los métodos de cada una de estas realizaciones pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de NMN.

Los siguientes métodos se describen en general en la presente, pero no se reivindican en la presente. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para incrementar los niveles de densidad ósea en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar niveles de densidad ósea aberrantemente bajos en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar una disminución de densidad ósea asociada con la edad en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar osteoporosis en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para prevenir una disminución de densidad ósea asociada con la edad en un sujeto. Los métodos de cada una de estas realizaciones pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de NMN.

En diferentes realizaciones, los inventores divulgan que la muerte de células neuronales fotorreceptoras y la visión se pueden rescatar por la administración de NMN. En diferentes realizaciones, los presentes inventores demuestran que la biosíntesis de NAD mediada por nicotinamida fosforribosil transferasa (NAMPT) puede desempeñar un papel en la supervivencia de neuronas PR de conos y/o bastones. En diferentes realizaciones, los presentes inventores demuestran que los niveles de NAD disminuidos pueden provocar función mitocondrial deteriorada en las neuronas PR, alteraciones en los metabolitos del ciclo de TCA y puede conducir a muerte celular y ceguera.

En algunas realizaciones, los inventores han demostrado que la eliminación de NAMPT puede conducir a la muerte de fotorreceptores, pérdida de estructura y función de retina normal y pérdida de visión. En algunas realizaciones, los inventores han demostrado que este daño a las neuronas fotorreceptoras y su función se puede revertir con la complementación de mononucleótido de nicotinamida (NMN), un producto de reacción enzimática NAMPT. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen administración de NMN para restaurar los niveles de NAD en la retina. En algunas realizaciones, la complementación con NMN puede ser una intervención terapéutica efectiva para muchas enfermedades degenerativas de la retina. Sin que se limite por la teoría, la complementación con NMN puede restaurar los niveles de NAD de retina.

En algunas realizaciones, los presentes inventores han demostrado *in vivo* usando modelos de ratón e *in vitro* usando líneas de células que la muerte de fotorreceptores se puede prevenir por complementación de NMN. En algunas realizaciones, se divulgan métodos de complementación de NMN para la prevención/tratamiento de muchas enfermedades degenerativas de retina.

Los siguientes métodos se describen en general en la presente, pero no se reivindican en la presente. En diferentes realizaciones, los inventores divulgan métodos para prevenir, métodos para reducir el riesgo de, y métodos para tratar diferentes enfermedades asociadas con disfunción de fotorreceptores, incluido, sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), enfermedades de retina hereditarias y adquiridas tal como, sin limitación, retinitis pigmentosa (RP), distrofismo de bastones y conos, y amaurosis congénita de Leber (LCA) por administración de NMN. En diferentes realizaciones, la administración de NMN puede ser una intervención efectiva para la prevención y/o tratamiento de enfermedades degenerativas de retina huérfanas que incluyen pero no se limitan a distrofia de bastones, distrofia de cono, retinitis pigmentosa, otras degeneraciones de retina hereditarias, amaurosis congénita de Leber (LCA) y degeneraciones de retina adquiridas tal como, pero no limitado a, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración de fotorreceptores después del desprendimiento de retina.

En diferentes realizaciones, NMN se puede administrar por cualquier vía de administración conocida por los expertos en la técnica, tal como, sin limitación, vía oral, parenteral, intraocular, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular. En diferentes realizaciones, NMN se puede administrar con o sin un excipiente.

Los siguientes métodos se describen en general en la presente, pero no se reivindican en la presente. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar degeneración macular en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar niveles de NAD de retina aberrante en un sujeto, incluidos niveles de NAD de retina aberrantemente bajos. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar degeneración de retina en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar daño de fotorreceptores en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar degeneración de fotorreceptores en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar la pérdida de visión asociada con degeneración de retina en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar pérdida de visión en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar la estructura de retina aberrante en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar la función de retina aberrante en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar la función de retina aberrante en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para incrementar los niveles de NAD de retina en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar degeneración macular en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar degeneración macular en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar niveles de NAD de retina aberrante en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar degeneración de retina en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar degeneración/daño de fotorreceptores en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar pérdida de visión asociada con degeneración de retina en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar pérdida de visión en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar estructura de retina aberrante en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar estructura de retina aberrante en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar función de retina aberrante en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para reducir el riesgo de desarrollar función de retina aberrante en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar disfunción de fotorreceptores en un sujeto. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar una enfermedad de retina en un sujeto. En diferentes realizaciones, estos métodos pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de mononucleótido de nicotinamida (NMN). En algunas realizaciones, una cantidad farmacéuticamente efectiva de mononucleótido de nicotinamida (NMN) puede ser una cantidad efectiva para incrementar los niveles de NAD de retina. En algunas realizaciones, una enfermedad de retina que se puede tratar por administración de NMN puede ser retinitis pigmentosa (RP), amaurosis congénita de Leber (LCA), distrofia de bastones, distrofia de conos, distrofia de bastones y conos, distrofia de conos y bastones, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración de fotorreceptores después de desprendimientos de retina o una combinación de lo mismo.

En diferentes realizaciones, cada uno de estos métodos independientemente puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de mononucleótido de nicotinamida (NMN). En algunas realizaciones, NMN se puede administrar a una velocidad de dosis de aproximadamente 100 mg por día, de 100 mg por día a 2000 mg por día, o aproximadamente 2000 mg por día. En algunas realizaciones, NMN se puede administrar a una velocidad de dosis de 0,5 mg, aproximadamente 0,5 mg, 1 mg, aproximadamente 1 mg, 5 mg, aproximadamente 5 mg, 10 mg, aproximadamente 10 mg, 20 mg, aproximadamente 20 mg, 30 mg, aproximadamente 30

mg, 40 mg, aproximadamente 40 mg, 50 mg, aproximadamente 50 mg, 60 mg, aproximadamente 60 mg, 70 mg, aproximadamente 70 mg, 80 mg, aproximadamente 80 mg, 90 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg por día, 100 mg por día, 150 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg por día, 200 mg por día, aproximadamente 300 mg por día, 300 mg por día, aproximadamente 400 mg por día, 400 mg por día, aproximadamente 500 mg por día, 500 mg por día, aproximadamente 600 mg por día, 600 mg por día, aproximadamente 700 mg por día, 700 mg por día, aproximadamente 800 mg por día, 800 mg por día, aproximadamente 900 mg por día, 900 mg por día, aproximadamente 1000 mg por día, 1000 mg por día, aproximadamente 1100 mg por día, 1100 mg por día, aproximadamente 1200 mg por día, 1200 mg por día, aproximadamente 1300 mg por día, 1300 mg por día, 1350 mg, aproximadamente 1350 mg, aproximadamente 1400 mg por día, 1400 mg por día, aproximadamente 1500 mg por día, 1500 mg por día, aproximadamente 1600 mg por día, 1600 mg por día, aproximadamente 1700 mg por día, 1700 mg por día, aproximadamente 1800 mg por día, 1800 mg por día, aproximadamente 1900 mg por día, 1900 mg por día, aproximadamente 2000 mg por día, 2000 mg por día, 2040 mg, aproximadamente 2040 mg, 2250 mg, aproximadamente 2250 mg, 2260 mg, aproximadamente 2260 mg, 2700 mg, aproximadamente 2700 mg, 2720 mg, aproximadamente 2720 mg, 3400 mg, aproximadamente 3400 mg, 3390 mg, aproximadamente 3390 mg, 3400 mg, aproximadamente 3400 mg, 3600 mg, aproximadamente 3600 mg, 4080 mg, aproximadamente 4080 mg, 4500 mg, aproximadamente 4500 mg, 4520 mg, aproximadamente 4520 mg, 5440 mg, aproximadamente 5440 mg, 5650 mg, aproximadamente 5650 mg, 6800 mg, aproximadamente 6800 mg o una alternancia o combinación de lo mismo. En algunas realizaciones, NMN se puede administrar a una velocidad de dosis de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día, de 100 mg/kg de peso corporal/día a 500 mg/kg de peso corporal/día, o aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal/día. En algunas realizaciones, NMN se puede administrar a una velocidad de dosis de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día, de 100 mg/kg de peso corporal/día a 300 mg/kg de peso corporal/día, o aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal/día. En algunas realizaciones, estos métodos pueden comprender administrar a un sujeto cualquiera de las composiciones farmacéuticamente aceptables de las presentes enseñanzas. En algunas realizaciones, estos métodos pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en administrar una formulación una vez al día. En algunas realizaciones, estos métodos pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en administrar una formulación dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. En algunas realizaciones, estos métodos pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en administrar una formulación de liberación sostenida una vez, o a intervalos largos tal como, sin limitación, una vez a la semana, bisemanal o una vez al mes.

En diferentes realizaciones, cada uno de estos métodos independientemente puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una formulación que comprende mononucleótido de nicotinamida (NMN) tal como, sin limitación, una píldora, una tableta, un comprimido oblongo, una cápsula, una tableta masticable, una tableta de disolución rápida, un polvo, una tableta efervescente, una cápsula de gelatina dura, una cápsula de gelatina blanda, un líquido no acuoso, un líquido acuoso, un gránulo, una cápsula, una suspensión, una solución, una emulsión, un jarabe, una solución o suspensión acuosa esterilizada, una solución o suspensión no acuosa, una formulación liofilizada, un supositorio o un producto alimenticio. En diferentes realizaciones, cada uno de estos métodos independientemente puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de mononucleótido de nicotinamida por administración oral, administración sublingual, administración parenteral, administración por inyección, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección intraocular, contacto ocular directo (gotas oftálmicas) o una combinación de lo mismo.

En diferentes realizaciones, un sujeto puede ser un mamífero. En diferentes realizaciones, un sujeto puede ser un vertebrado, tal como un mamífero, un pez, un ave o un reptil. Un mamífero puede ser, sin limitación, un humano, un roedor, un canino, un felino, un bovino, un ovino, un equino o un porcino. En algunas realizaciones, un sujeto puede ser un ave tal como un pollo, un reptil, un pez u otro organismo acuático.

En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para aumentar los niveles de NAD⁺ durante el envejecimiento con administración de NMN para mantener una mezcla de NSPC, a través de la administración de NMN. En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para mejorar los niveles de NAD⁺ en las NSPC en un sujeto a través de la administración de NMN, para conservar una población de NSPC endógena para la reparación de cerebro envejecido, enfermo o dañado.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la estructura del mononucleótido de nicotinamida (NMN).
 La figura 2 ilustra el incremento de peso corporal asociado con la edad.
 La figura 3 ilustra la ganancia de peso corporal asociada con la edad.
 La figura 4 ilustra el consumo de oxígeno en ratones de control, administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN.
 La figura 5 ilustra el gasto energético en ratones de control, administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN.
 La figura 6 ilustra el coeficiente respiratorio en ratones de control, administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN.
 La figura 7 ilustra los niveles en sangre de (A) colesterol, (B) triglicéridos y (C) ácidos grasos libres mostrados durante 12 meses en el control y las cohortes administradas con 100 y 300 mg/kg de NMN.
 La figura 8 ilustra los niveles en sangre coincidentes con el peso corporal de (A) colesterol, (B) triglicéridos y (C) ácidos grasos libres mostrados durante 12 meses en el control y las cohortes administradas con 100 y 300 mg/kg de NMN.

La figura 9 ilustra la tolerancia a la insulina mostrada en (A) niveles de glucosa en sangre y (B) cambios porcentuales de glucosa en el control y los grupos administrados con 100 mg/kg y 300 mg/kg de NMN en el punto de tiempo de 12 meses. La figura 10 ilustra las respuestas de congelación de ratones tratados con NMN, de control alimentados con comida normal, alimentados con HFD y alimentados con HFD en pruebas de acondicionamiento miedo contextual y con claves en el día 1, día 2 y día 3.

La figura 11 ilustra imágenes de biomicroscopía de fondo de ratones de control y administrados con NMN.

La figura 12 ilustra electrorretinogramas de ratones de control y administrados con NMN.

La figura 13 ilustra la producción de lágrimas en ratones de control de 18 meses de edad y administrados con NMN. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM. $^{**}p < 0,01$.

La figura 14 ilustra los niveles de NAD⁺ en el hipocampo y la expresión de Nampt disminuyendo con la edad. A) Biosíntesis de NAD⁺ a partir de nicotinamida. B) Análisis por HPLC de los niveles de NAD⁺ en extractos de hipocampo. C-D) Cuantificación de inmunofluorescencia para Nampt en la zona subgranular (SGZ). Medición de los niveles umbrales de inmunorreactividad de Nampt (C) y el número de células Nampt⁺ altamente inmunorreactivas (D) a lo largo de la SGZ. E) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Dapi y Nampt en la SGZ en ratones jóvenes (6 meses de edad) y viejos (18 meses de edad).

La figura 15 ilustra que Nampt se expresa en una subpoblación de NSPC de SGZ. A-C) Imágenes de fluorescencia representativas para marcadores Dapi (azul original), Nampt (rojo original) y NSPC (Sox2, Gfap y Nestina-GFP 3 días después de la inyección de tamoxifeno; verde original) en la SGZ. Las líneas punteadas denotan la SGZ. D) Cuantificación de los porcentajes de células positivas para marcador de NSPC en la SGZ que también expresan Nampt en ratones de 3 a 6 meses de edad.

La figura 16 ilustra que la delección específica de NSPC adultas de Nampt altera la proliferación y auto-renovación de NSPC *in vivo*. A) Para valorar la proliferación, los ratones iNSPC-Nampt-KO y los controles de compañeros de camada se sometieron a tres rondas de 5 inyecciones de tamoxifeno (TAM) (1 inyección por día, con 6 semanas de diferencia). El sacrificio se realizó a 6 meses de edad. B) Un esquema para la especificidad de los marcadores valorados. C-F) Cuantificación de las NSPC radiales Nestina⁺ (n = 15-16 ratones) (C), células proliferantes BrdU⁺ (n = 14-16 ratones) (D), células proliferantes Ki67⁺ (n = 7 ratones) (E) y neuronas recién nacidas (Dcx⁺, n = 15-20 ratones) (F), por unidad de área del giro dentado (DG) en ratones de control e iNSPC-Nampt-KO. Para el etiquetado de BrdU, se administraron 4 inyecciones de BrdU a 100 mg/kg de peso corporal dados de manera intraperitoneal durante 48 horas. G) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Gfap (azul original), Dcx (verde original) y BrdU (rojo original) en la zona subgranular (SGZ). La barra de escala indica 200 μ m. H) Para valorar la diferenciación, los compañeros de camada de control y los ratones iNSPC-Nampt-KO se sometieron a 4 inyecciones de TAM totales (2 inyecciones en el primer día acopladas con BrdU a 100 mg/kg de peso corporal, así como 2 inyecciones totales en los 2 días posteriores). I) Cuantificación del porcentaje de células BrdU⁺ en el DG que también expresan marcadores de NSPC (Gfap⁺, Nestina⁺), neuronas recién nacidas (Dcx⁺) y OPC/oligodendrocitos (Olig2⁺) (n = 6-13 ratones). J) Cuantificación de NSPC nestina⁺ radiales en ratones C57Bl6 de 6 y 18 meses de edad y ratones C57Bl6 de 18 meses de edad tratados con 100 o 300 mg/kg de peso corporal de NMN en su agua potable durante 12 meses (n = 5 ratones). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. $^{*}P < 0,05$. $^{**}P < 0,01$. $^{***}P < 0,001$.

La figura 17 ilustra que la inhibición de Nampt en las NSPC *in vitro* perjudica la biosíntesis y proliferación de NAD⁺. Las neuroesferas se cultivaron con el inhibidor específico de Nampt FK866 (10 nM) con o sin NMN (100 μ M) durante 48 horas. A) Análisis por HPLC de los niveles de NAD⁺ (n = 6). B) Cuantificación del cambio múltiplo del número de células en neuroesferas (n = 6-30). C) Imagen de campo brillante representativa de neuroesferas. La barra de escala denota 10 μ m. D) Rutas relacionadas con el ciclo celular entre las 50 rutas biológicas principales disminuidas de forma regulada por FK866. El análisis paramétrico del enriquecimiento génico (PAGE) se llevó a cabo con base en análisis de microarreglo. Ver sección de métodos. E) Resultados de RT-PCR cuantitativa para expresión de ARNm de ciclina E2 (*Ccne2*), ciclina E1 (*Ccne1*), ciclina A2 (*Ccna2*) y E2F1 (n = 3). F) Análisis FACS de NSPC tratadas con FK866 (n = 8). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. $^{*}P < 0,05$. $^{**}P < 0,01$. $^{***}P < 0,001$.

La figura 18 ilustra que la ablación genética de *Nampt* en las NSPC *in vitro* perjudica la biosíntesis, proliferación y diferenciación de NAD⁺. Las neuroesferas se aislaron de ratones *Nampt^{flox/flox}* y se infectaron con un adenovirus que expresa Cre-recombinasa (*Nampt AD-Cre*) o un adenovirus de control que expresa LacZ (*Nampt AD-LacZ*). A) Análisis por HPLC de los niveles de NAD⁺ con y sin NMN (100 μ M, 48 horas) (n = 10-22). B-C) Cuantificación del cambio múltiplo en el número de células (n = 13-50) y diámetro de neuroesferas (n = 9 muestras independientes, 57-96 neuroesferas). D) Imágenes representativas de neuroesferas 7 días después de la disociación. Las barras de escala indican 10 μ m. E) El número de neuroesferas formadas 7 días después de colocar en placa las células disociadas a 100 células/ml, 0,5 ml/pozo en placas de 24 pozos (n = 8 muestras independientes, 48-84 pozos). F-G) Las neuroesferas infectadas con *Nampt AD-Cre* y *Nampt AD-LacZ* se cultivaron sin NMN hasta que las neuroesferas infectadas con *Nampt AD-Cre* mostraron un defecto de crecimiento. Los cultivos entonces se pasaron y se colocaron en placas a igual densidad con o sin NMN (200 μ M). Se cuantificaron los cambios múltiplo en el número de células (F) (n = 6), y los porcentajes de células Dapi⁺ totales que expresan células Ki67⁺ (G) (n = 3 muestras independientes, 9 campos de visión). H-L) Los porcentajes de células Dapi⁺ totales que expresan los marcadores específicos de tipo celular indicados (H) por inmunofluorescencia después de 6-7 días de diferenciación: O4 (I), Gfap (J) y p-III-tubulina (K) (n = 3-6 muestras independientes, 23-43 campos de visión). El efecto de NMN también se examinó para O4, S100 β , TUNEL y nestina (L) (n = 3-6 muestras independientes, 10-26 campos de visión). * , $^{\wedge}$ y $^{\#}$ indican significancia estadística entre *Nampt AD-LacZ* y *Nampt AD-Cre*, *Nampt AD-LacZ* y *Nampt AD-LacZ*+NMN, y *Nampt AD-Cre* y *Nampt AD-Cre*+NMN, respectivamente. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. $^{*}P < 0,05$. $^{**}P < 0,01$. $^{***}P < 0,001$.

La figura 19 ilustra que la ablación genética de *Nampt in vitro* perjudica la formación de OPC. A) Un esquema para la diferenciación de oligodendrocitos con marcadores específicos de etapa. B-C) Las neuroesferas se infectaron con un

adenovirus que expresa Cre recombinasa (Namt AD-Cre) o un adenovirus de control que expresa LacZ (Namt AD-LacZ). Para valorar la formación de oligodendrocitos, se cosecharon las neuroesferas disociadas después de 6-7 días de diferenciación (B). Para valorar la formación de OPC, se examinaron las neuroesferas disociadas después de 2 días de diferenciación (C). Se valoraron los marcadores de NSPC (Gfap, nestina), OPC (Pdgfra +) y células de linaje de oligodendrocitos (Olig2+, O4+) (n = 3-9 muestras independientes, 6-51 campos de visión). D) Tratamiento de neuroesferas disociadas con el inhibidor selectivo de Sirt1, EX527 (80 μ M) o el inhibidor selectivo de Sirt2, AGK2 (10 μ M). La formación de oligodendrocitos se evaluó después de 6-7 días de diferenciación (n = 6-11 muestras independientes, 21-32 campos de visión). E-G) Las neuroesferas de inactivación y de control se formaron al infectar con un adenovirus que expresa Cre-recombinasa o un adenovirus de control que expresa LacZ, respectivamente. E) Las neuroesferas se aislaron de ratones Sirt1^{flox/flox} y ratones Sirt1^{flox/flox};Sirt2^{-/-}. La formación de oligodendrocitos se evaluó después de 6-7 días de diferenciación (n = 3-11 muestras independientes, 12-28 campos de visión). F-G) Las neuroesferas se aislaron de ratones Nampt^{flox/flox} (F, n = 8-9) o ratones Sirt1^{flox/flox};Sirt2^{-/-} (G, n = 3-7) y se diferenciaron durante 2 días. Resultados de RT-PCR cuantitativa para expresión de ARNm de genes de linaje de oligodendrocitos. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001.

La figura 20 ilustra que la delección específica de NSPC adultas de Nampt altera la auto-renovación y diferenciación de NSPC en respuesta a desmielinización inducida por insulto *in vivo*. A) Cuantificación del porcentaje de células positivas para Nestina-GFP en la SVZ que también expresan Olig2 en ratones iNSPC-GFP (n = 7) e iNSPC-Nampt-KO (n = 8) 7 días después de la inyección inicial de TAM. B) Los ratones iNSPC-Nampt-KO y de control de iNSPC-GFP de 6 a 9 semanas de edad se alimentaron con una dieta que contiene 0,2 % de cuprizona durante 4-5 semanas. La delección de Nampt en la población Nestina+ adulta se indujo por 5 inyecciones de tamoxifeno (TAM) a 180 mg/kg de peso corporal por día la semana antes de iniciar la dieta de cuprizona. C) Un esquema de una sección cerebral de ratón coronal. Las áreas de recuadro rojo originales indican regiones usadas para cuantificación. La línea punteada roja original indica la SGZ. CC, cuerpo calloso; DHC, comisura de hipocampo dorsal; DG, giro dentado; HPF, formación de hipocampo; SCZ, zona subcallosa; SGZ, zona subgranular; V3, tercer ventrículo. D) Cuantificación del número de células NestinaGFP+ por unidad de área en el CC. E) Un esquema para la especificidad de los marcadores valorados. F-I) Cuantificación de los porcentajes de células NestinaGFP+ que expresan marcadores de NSPC (nestina, Gfap) u marcadores de oligodendrocitos (Sox10, Apc) en el CC (n = 2-11 ratones). * y ^ indican significancia estadística entre compañeros de camada de control iNSPC-GFP y ratones iNSPC-Nampt-KO y entre ratones iNSPC-GFP alimentados con comida regular y alimentados con cuprizona, respectivamente. J) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Dapi (azul), Nampt (rojo) y Olig2 (verde) en el CC. Las flechas indican ejemplos de colocalización. Las barras de escala denotan 20 μ m. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **, ^P < 0,01. ***, ^^P < 0,001.

La figura 21 ilustra un modelo para el papel de la biosíntesis de NAD mediada por Nampt en las NSPC. La biosíntesis de NAD+ mediada por Nampt promueve la autorrenovación, proliferación y diferenciación de NSPC en oligodendrocitos. En tanto que el mecanismo por el cual Nampt promueve la auto-renovación y proliferación sigue sin identificarse, la biosíntesis de NAD+ mediada por Nampt activa Sirt1 y Sirt2 para promover las decisiones de destino de linaje de oligodendrocitos NSPC por un mecanismo que implica la disminución de forma regulada transcripcional de Pdgfra, Sox10 y Nkx2.2 y el aumento de forma regulada transcripcional de p21 (*cdkn1a*). Sirt1 y Sirt2 pueden actuar mediante un efecto sobre la actividad de Olig2. Ver texto para un análisis detallado.

La figura 22 ilustra Nampt expresada en una subpoblación de NSPC de SGZ. A-C, H-I) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para marcadores específicos de Dapi (azul), Nampt (rojo) y tipo de célula (NeuN: neuronas maduras, S100 β : astrocitos maduros, Ki67: células proliferantes, Olig2: células de linaje de oligodendrocitos; verde) en la zona subgranular (SGZ). Las líneas punteadas denotan la SGZ. Las puntas de flecha individuales indican ejemplos de colocalización. Las puntas de flecha dobles indican ejemplos de no-colocalización. Las barras de escala indican 10 μ m. B) Ampliación de la región en recuadro mostrada en A). D) Un esquema para la especificidad de los marcadores valorados. E) Porcentaje de células Dapi+ que expresan el marcador neuronal NeuN en la SGZ (n = 5). F) Porcentaje de células Dapi+ que expresan el marcador de NSPC Sox2 en la SGZ (n = 5). G) Cuantificación de los porcentajes de células positivas para marcador que también expresan Nampt en la SGZ (Ki67: n = 304 células de 13 ratones; Olig2: n = 122 células de 10 ratones).

La figura 23 ilustra que la delección específica de NSPC adultas de Nampt altera la proliferación y auto-renovación de NSPC *in vivo*. A-F) Los ratones iNSPC-Nampt-KO y de control de compañeros de camada (iNSPC-GFP) se inyectaron con tamoxifeno (TAM) o vehículo (5 inyecciones totales, 1 inyección por día). A-B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Dapi (azul), caspasa 3 activada (roja) y NestinaGFP (verde) en las regiones cerebrales indicadas a 28 (A) o 3 (B) días después de la inyección de TAM. Las flechas resaltan las raras células de caspasa activada 3+ observadas. Las barras de escala indican 50 μ m. A) Los ratones iNSPC-GFP de control se trataron con aceite o TAM para asegurar que no había fugas de expresión de indicador NestinaGFP. B) Los ratones iNSPC-Nampt-KO o iNSPC-GFP se trataron con TAM. C) PCR de recombinación-confirmatoria realizada en ADN de hipocampo de ratones iNSPC-Nampt-KO (KO) y control tratados con TAM (n = 7-8). D) Cuantificación de los porcentajes de células positivas para Nestina en la SGZ que también expresan marcadores de NSPC (Sox2: n = 190 células de 7 ratones; Gfap: n = 208 células de 7 ratones) o neuronales (Dcx, NeuN, n = 473 células de 7 ratones) en ratones iNSPC-GFP de 3 a 6 meses de edad 7 días después de la inyección inicial de TAM. E) Cuantificación de los porcentajes de células positivas para NestinaGFP que también expresan Nampt en ratones iNSPC-Nampt-KO e iNSPC-GFP en el DG en los días indicados después de la inyección inicial de TAM (n = más de 350 células de 7 ratones). F) Las neuronas recién nacidas (Dcx+, n = 12-16) se clasificaron por la longitud de su proyección por unidad de área del giro dentado (DG). G) Los ratones se inyectaron con NMN (500 mg/kg de peso corporal, IP), y los niveles de NAD+ de hipocampo se midieron por HPLC en los puntos de tiempo indicados después de la inyección (n = 3-9). H-I) A los ratones se les administró NMN (100 o 300 mg/kg de peso corporal) en su agua potable de 6 a 18 meses de edad.

La figura 24 ilustra que la inhibición de Nampt en las NSPC perjudica la biosíntesis y proliferación de NAD⁺ *in vitro*. Las neuroesferas se cultivaron con el inhibidor específico de Nampt FK866 (10 nM) con o sin NMN (100 µM) durante 24 (A-B) o 48 horas (C-G). A) Análisis por HPLC de los niveles de NAD⁺ (n = 6). B) Cuantificación del cambio múltiplo del número de células en neuroesferas bajo cada condición indicada (n = 5-11). C) Una inmunotransferencia representativa de neuroesferas tratadas con FK866. D-E) Cuantificación de inmunotransferencias para Ki67 (D) y PcnA (E) normalizadas por actina en neuroesferas (n = 6). F-G) Las 50 rutas biológicas principales se disminuyeron de forma regulada (F) o aumentaron de forma regulada (G) por FK866.

La figura 25 ilustra que la ablación genética de Nampt en las NSPC *in vitro* perjudica la biosíntesis, proliferación y diferenciación de NAD⁺. A-G) Las neuroesferas se aislaron de ratones Nampt^{flox/flox} y se infectaron con un adenovirus que expresa Cre-recombinasa (Nampt AD-Cre) o un adenovirus de control que expresa LacZ (Nampt AD-LacZ). A) Resultados de RT-PCR cuantitativa para expresión de ARNm de Nampt en neuroesferas infectadas con AD-LacZ y Nampt Ad-Cre (n = 3-33). B) Inmunotransferencias representativas para Nampt y Gapdh. C) Cuantificación de inmunotransferencias para Nampt en neuroesferas normalizadas por Gapdh (n = 4-13). D) Análisis por HPLC de los niveles de NAD⁺. Los niveles de NAD⁺ en neuroesferas infectadas con Nampt Ad-Cre se normalizaron por niveles de NAD⁺ en neuroesferas infectadas con Nampt Ad-LacZ (n = 4-9). E) Inmunotransferencias representativas de neuroesferas infectadas con Nampt Ad-Cre o Nampt AD-LacZ 8 días después de la infección para marcadores de muerte celular (caspasa 3 activada) y proliferación (Ki67, PcnA). Las neuroesferas se cultivaron bajo condiciones de proliferación (transferencia izquierda) o se diferenciaron durante 2 días (transferencia derecha). F) Análisis de inmunofluorescencia de neuroesferas disociadas cultivadas en medios de proliferación. El histograma muestra los porcentajes de caspasa 3+ activada (n = 3 muestras independientes, 6 campos de visión) o células TUNEL+ (n = 9 muestras independientes, 14-21 campos de visión) con respecto al número total de células Dapi+. G) Un esquema para el protocolo de diferenciación de linaje no dirigido usado.

La figura 26 ilustra A) un esquema para el protocolo de diferenciación de linaje oligodendrocítico usado. B) El histograma muestra los porcentajes de células Dapi+ que expresan marcadores de NSPC (Gfap, Nestina), OPC (Pdgfra +, Olig2+) y astrocitos (S100β) (n = 3-12 muestras independientes, 6-30 campos de visión). C) Una inmunotransferencia representativa para Sirt2 en neuroesferas cultivadas como NSPC (con EGF, FGF) u OPC (con EGF, FGF, PDGFA) antes y después de la diferenciación. D) Inmunofluorescencia para Dapi (azul original), Nampt (rojo original) y Sirt2 (verde original) a lo largo de la SGZ. Las líneas punteadas denotan la SGZ. Las puntas de flecha individuales indican ejemplos de colocalización de la inmunoreactividad celular. La barra de escala indica 10 µm. E-F) Inmunofluorescencia para Dapi (azul), Sirt2 (rojo) y NestinaGFP (verde original, 3 días después de TAM) a lo largo de la SGZ. Las líneas punteadas denotan la SGZ. E) La barra de escala indica 50 µm. F) La barra de escala indica 20 µm. G-H) Las neuroesferas se aislaron de ratones Sirt1 flox/flox y se infectaron con un adenovirus que expresa Cre recombinasa (Sirt1 AD-Cre) o un adenovirus de control que expresa LacZ (Sirt1 AD-LacZ). G) Resultados de RT-PCR cuantitativa para expresión de ARNm de Sirt1 (n = 17-24). H-J) Cuantificación del cambio múltiplo en el número de células (n = 5-20). Las neuroesferas se derivaron de ratones Sirt1 KO de cuerpo completo (I), ratones Sirt2 KO (J) y sus respectivos controles de compañeros de camada.

La figura 27 ilustra que la delección específica de NSPC adultas de Nampt altera la auto-renovación de NSPC en respuesta a desmielinización inducida por insulto *in vivo*. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Dapi (azul), nestina (rojo) y nestinaGFP (verde), y en ratones alimentados con comida regular (RC) y alimentados con cuprizona (CUPR) en las regiones indicadas del cerebro: Zona subgranular; SVZ, zona subventricular; CC, cuerpo caloso. Las barras de escala indican 20 µm. B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Dapi (azul), MBP (rojo) y NestinaGFP (verde) en ratones alimentados con comida y alimentados con cuprizona regulares antes y después de 1 semana de recuperación en la SGZ. Las barras de escala indican 20 µm. C-G) Cuantificación del número de células NestinaGFP+ por unidad de área del giro dentado (C) y porcentajes de células NestinaGFP+ que expresan marcadores de NSPC (nestina, Gfap) u marcadores de oligodendrocitos (Sox10, Ape) en la SGZ (D-G) (n = 5-12 ratones). * y ^ indican significancia estadística entre compañeros de camada de control iNSPC-GFP y ratones iNSPC-Nampt-KO y entre ratones iNSPC-GFP alimentados con comida regular y alimentados con cuprizona, respectivamente. H) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Dapi (azul), Nampt (rojo) y Sox2 (verde) en el CC. Las flechas indican ejemplos de colocalización de la inmunoreactividad. Las barras de escala indican 20 µm.

La figura 28 ilustra la ruta de biosíntesis de NAD a partir de nicotinamida. (A) El paso limitante de velocidad catalizado por la nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT). Nic, nicotinamida; PRPP, 5'-fosforibosil-1-pirofosfato; NMN, mononucleótido de nicotinamida; PPI, pirofosfato. (B) La ruta de biosíntesis de NAD a partir de nicotinamida.

La figura 29 ilustra la densidad mineral ósea (DMO) en ratones de control y tratados con NMN en el punto de tiempo de 12 meses medido por absorciometría de rayos X de energía dual (DXA).

La figura 30 ilustra (A-B) retinas de ratones NAMPT bastón-CKO que mostraron una reducción significativa de NAMPT dentro de bastones por PCR, inmunohistoquímica e inmunotransferencia. (C) La degeneración de retina neurosensorial se asoció con atrofia secundaria y palidez del nervio óptico. (D-F) Se realizó electroretinografía (ERG) para medir la función de neurona PR y de retina. (G) Las mediciones de agudeza visual confirmaron la pérdida de visión en ratones bastón-CKO. (H) Examinación histopatológica de ojos de ratones NAMPT bastón-CKO. (I) Mediciones de NAD normalizadas obtenidas de las retinas enteras NAMPT bastón-cko. (J-L) Los ratones CKO tratados con NMN mostraron un rescate significativo de la función fotópica y escotópica.

La figura 31 ilustra (A) ratones NAMPT cono-CKO (B-D) ERG demostró disminución progresiva en la función de cono. (E) Disminución significativa de la agudeza visual en ratones cono-CKO. (F-H) Función de ERG en comparación con ratones cono-CKO tratados con PBS. (I-J) El tratamiento con FK866 de células cónicas *in vitro* provoca disminución en los niveles de NAD intracelular y muerte celular significativa después de las 4 horas de tratamiento. (I-K) NMN (100 µM) fue capaz de rescatar completamente las células.

La figura 32 ilustra (A-J) la función y estructura de neurona de retina y PR. (K-L) Examinación de ratones que tuvieron función y estructura de retina normal.

La figura 33 ilustra (A-B) examinación con microscopio electrónico. (C) Papel de NAD en los efectos mediados por NAMPT en las neuronas PR.

5 La figura 34 ilustra el efecto de tratamiento con NMN en controles de compañeros de camada.

La figura 35 ilustra función y estructura de neurona de retina y PR.

La figura 36 ilustra los cambios en los segmentos interiores que se pueden identificar en ratones bastón-CKO.

Descripción detallada

10

Abreviaturas

BMD: Densidad mineral ósea

CC: Cuerpo calloso

15

DG: Giro dentado

DXA: Absorciometría de rayos X de energía dual

EIR: Liberación inmediata mejorada

ERG: Electrorretinografía

FFA: Ácido graso libre

20

HFD: Dieta alta en grasas

NMN: Mononucleótido de nicotinamida

OPC: Células precursoras de oligodendrocitos

PR: Fotorreceptor

SGZ: Zona subgranular

25

SVZ: Zona subventricular

Métodos

30

Los métodos y composiciones descritos en la presente utilizan técnicas de laboratorio bien conocidas por los expertos en la técnica, y se pueden encontrar en manuales de laboratorio tal como Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Spector, D. L. et al., Cells: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998; Nagy, A., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition), Cold Spring Harbor, NY, 2003 y Harlow, E., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999. Los métodos de administración de productos farmacéuticos y regímenes de dosis, se pueden determinar de acuerdo con los principios estándar de farmacología bien conocidos por los expertos en la técnica, usando métodos proporcionados por textos de referencia estándar tal como Remington: the Science and Practice of Pharmacy (Alfonso R. Gennaro ed. 19th ed. 1995); Hardman, J.G., et al., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, 1996; y Rowe, R.C., et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Fourth Edition, Pharmaceutical Press, 2003. Como se usa en la presente descripción y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" se propone que incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique lo contrario.

40

Los siguientes métodos son aplicables a los ejemplos 1-7.

45

Administración de NMN a través de agua potable y determinación de toxicidad y estabilidad de NMN

Se llevó a cabo un estudio de administración de NMN de 12 meses de duración usando ratones tipo silvestre bajo una condición de alimentación regular. Se administró NMN a través de agua potable, y se probaron dos dosis de NMN, 100 y 300 mg/kg de peso corporal/día. La estabilidad de NMN se examinó en agua potable y se encontró que NMN fue estable en solución. No se observó degradación significativa a temperatura ambiente. La ingesta de agua también se monitoreó muy cuidadosamente y la ingesta de agua no cambió significativamente durante el período experimental. Para valorar los efectos adversos beneficiosos y posibles de NMN, se monitorearon periódicamente una variedad de parámetros fisiológicos, incluido peso corporal, temperatura corporal, ingesta de alimentos y agua, niveles de glucosa en sangre con alimento y en ayunas, paneles de lípidos plasmáticos con alimentos y en ayunas, y tolerancia a glucosa e insulina, en ratones de control y administrados con NMN. También se verificaron la química sanguínea, conteos de células sanguíneas, prueba de tira de orina y otras pruebas fisiológicas, incluida prueba de actividad física. Con base en todas estas valoraciones, no se observaron efectos adversos, tal como desnutrición, o signos de toxicidad en ninguno de los grupos de 100 mg/kg o 300 mg/kg.

50

55

60

Estudio de función de memoria

Dos grupos de ratones C57BL/6 tipo silvestre a ~2 meses de edad se alimentaron con una dieta alta en grasas (HFD) que contiene 42 % de las calorías totales de grasa (TD88137; Harlan Taklad). NMN a una dosis de 300 mg/kg/día comenzó a administrarse a través de agua potable a uno de los grupos alimentados con HFD después de 4 meses de alimentación con HFD. El grupo de control se alimentó con una comida regular. Después de 8 meses de alimentación con HFD con o

65

sin 4 meses de tratamiento con NMN, se realizó la prueba de condicionamiento de miedo contextual, una prueba sensible para examinar la función de memoria que implica el hipocampo, para ratones en estos tres grupos.

Los siguientes métodos son aplicables a los ejemplos 8-15.

Ratones

Los ratones se mantuvieron en una comida regular *ad libitum* en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luces encendidas de 6 am a 6 pm). Los ratones Namp1^{fl}/flox (Rongvaux et al, 2008), en los cuales los exones 5 y 6 del gen Namp1 se flanquean por sitios loxP, se cruzaron con ratones Nestina-CreERT2 (Lagace et al, 2007) para generar ratones Namp1^{fl}/flox⁺; Cre doble heterocigotos. Se criaron ratones heterocigotos dobles con ratones Namp1^{fl}/flox para obtener ratones Namp1^{fl}/flox⁺; Cre mutantes (ratones iNSPC-Namp1-KO) en la relación mendeliana esperada. Para rastrear la progenie de NSPC adultas y confirmar la especificidad y magnitud de la recombinación inducida por inyección de tamoxifeno, se cruzaron ratones iNSPC-Namp1-KO y Nestina-CreERT2 con una cepa de ratón indicadora que expresa un casete STOP flanqueado por loxP que evita la transcripción de la proteína fluorescente verde mejorada corriente abajo [ZsGreen1; Jackson Laboratories #7906 (Madisen et al, 2010)]. La PCR de recombinación en extractos de hipocampo de ratones tratados con tamoxifeno o vehículo mostró una delección exitosa tras el tratamiento con tamoxifeno (figura 23C).

Inducción de delección de Namp1

Las inyecciones de tamoxifeno se realizaron como se describió previamente (Lagace et al, 2007). En resumen, a los ratones iNSPC-Namp1-KO (5-7 semanas de edad) se les administró tamoxifeno (TAM, Sigma T5648) a 180 mg/kg/d durante 5 días (d, de manera intraperitoneal; disuelto en 10 % de EtOH/90 % de aceite de girasol), un protocolo que produce una recombinación máxima con una letalidad mínima (5 %) (Lagace et al, 2007).

Incorporación de BrdU

Se diluyó 5'-bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma, B9285) en solución salina estéril y se administró por inyecciones intraperitoneales (100 mg/kg de peso corporal). Para el análisis de los efectos acumulativos de la pérdida de Namp1, a los ratones se les dio BrdU dos veces al día durante 2 días y se sacrificaron al día siguiente o 28 días después. Para el análisis del efecto de la pérdida de Namp1 en la diferenciación de NSC adultas y la diferenciación de oligodendrocitos postnatales, a los ratones se les dio BrdU dos veces al día durante 1 día y se sacrificaron 2 días después.

Cuprizona

La desmielinización se indujo al alimentar ratones de 6 a 8 semanas de edad con una dieta que contiene 0,2 % de cuprizona (bis-ciclohexanona oxaldihidrazona; Sigma C9012) mezclada en una comida para roedores estándar molida durante 4 a 5 semanas (Harlan Laboratories, TD.01453). Para permitir la recuperación del tratamiento con cuprizona, los alimentos se reemplazaron con comida estándar durante 1 semana adicional. Se ha mostrado que este protocolo desmieliniza y remieliniza de manera exitosa el hipocampo (Skripuletz et al, 2011).

Inmunofluorescencia

Todas las secciones de tejido se incubaron y las células se incubaron en solución de bloqueo/permeabilización que contiene suero de cabra normal al 10 %, BSA al 1 % y Triton-X al 0,3 % en PBS durante 45 a 60 min antes de 24 o 48 h de incubación con anticuerpos primarios en suero de cabra normal al 5 % y Triton-X al 0,1 % en PBS a 4 °C a las concentraciones listadas más adelante. Se adicionaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa627, Alexa488 o Cy3 diluidos en suero de cabra normal al 2 %, BSA al 1 % y Triton-X al 0,1 % en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (Sigma) durante 10 min a temperatura ambiente.

Las células se cosecharon por fijación con paraformaldehído al 4 % en PBS (15 min). Los ratones se anestesiaron por inyección i.p. de ketamina y xilazina, y se perfundieron de manera transcardial a través del ventrículo izquierdo con amortiguador de fosfato 0,1 M frío a pH 7,4 seguido de una solución amortiguada con fosfato de 4 % de paraformaldehído (PFA). Los cerebros se fijaron posteriormente con PFA al 4 % durante la noche y se colocaron en sacarosa al 15 % seguido de sacarosa al 30 %, se congelaron y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Las secciones coronales (30 µm) se hicieron por criostato en una serie 1 en 8 y se almacenaron a -30 °C en crioprotector hasta el uso. Para remover cualquier actividad de peroxidasa endógena, todas las secciones se incubaron con H₂O₂ al 3 % durante 10 min. Las secciones de tejido usadas para valorar la incorporación de BrdU se trataron antes del procedimiento de inmunotinción con formamida al 50 % en solución salina 2x/citrato de sodio (SSC) a 65 °C durante 2 h, HCl 2N durante 30 min a 37 °C, borato 0,1 M pH 8,5, y entonces se lavaron dos veces con PBS antes de proceder con el protocolo de tinción. Las secciones de tejido no usadas para valorar la incorporación de BrdU se incubaron en formamida al 50 % en solución salina 2x/citrato de sodio (SSC) a 65 °C durante 2 h o amortiguador de citrato 10 mM a 65 °C durante 1 h antes de proceder con el protocolo de tinción. La detección de Dcx, Nestina, Namp1 y APC se realizó usando el kit de fluoresceína TSA-Plus (PerkinElmer).

Cuantificación

Para las secciones de tejido, se realizó imagenología microscópica de alto aumento (20x, 0.8DICII o 40x aceite 1.3DICII) usando una Zeiss Axioimage.Z1. Las imágenes se tomaron en pilas z de pasos de 1 µm a través del intervalo de inmunorreactividad de sección de tejido. Para la esquina dorsolateral de la SVZ, se tomaron imágenes de bregma de 1,10 a -0,10 mm. Para el cuerpo calloso, se tomaron imágenes de bregma -1,06 a -2,54 mm. Para el giro dentado, se tomaron imágenes de bregma -1,34 a -3,64 mm. La cuantificación se realizó a ciegas para genotipo en 3-8 secciones de tejido por animal. Las densidades celulares se estimaron por el número de células inmunorreactivas dividido por el área de la estructura, medida con ImageJ. La verificación de la colocalización se logró por importación de pilas de imágenes Z en ImageJ y la realización de representación 3D. Para las células, se realizó imagenología microscópica 10 o 20x usando una Zeiss Axioimage.Z1. La cuantificación se realizó a ciegas para genotipo en 2 a 3 campos de visión por muestra y tratamiento, de 3 a 9 muestras independientes.

Medición de NAD⁺

Los niveles de NAD⁺ se determinaron usando un sistema de HPLC (Shimadzu) con una columna Supelco LC-18-T (15 cm x 4,6 cm; Sigma), como se describió previamente (Yoshino et al, 2011).

Microarreglos y análisis bioinformático

Para genes individuales, los datos de microarreglos sin procesar se sometieron a transformación de puntuación Z, y las relaciones Z se calcularon como se describió previamente (Cheadle et al, 2003). El análisis posterior y análisis paramétrico de enriquecimiento de conjuntos de genes (PAGE) se realizó como se describió previamente (Yoshino et al, 2011). Los datos de microarreglo usados en este estudio se han depositado en la base de datos NCBI GEO (número de acceso GEO GSE49784).

Transferencia Western

Se prepararon extractos de proteína (15-50 µg) de neuroesferas o hipocampos de ratón como se describió previamente (Yoshino et al, 2011).

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total se extrajo del hipocampo usando un kit RNeasy (Qiagen) y se transcribió inversamente en ADNc con un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). La RT-PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo con la mezcla TaqMan Fast Universal PCR Master y los cebadores TaqMan apropiados para cada gen con el sistema de detección de secuencia rápida GeneAmp 7500 (Applied Biosystems). Los niveles de expresión relativos se calcularon para cada gen al normalizar a niveles de Gapdh y entonces a un control.

Reactivos

Se usaron los siguientes anticuerpos primarios y secundarios:

Anticuerpos primarios y sus usos o especificidades de tipo de célula (Ver von Bohlen und Halbach, 2011): Actina: normalización, WB 1:4000 CPO1, Sigma; Gapdh: normalización, WB 1:4000 6C5 Millipore CB1001; Namp1: IHC 1:1000; WB 1:3000 Alexis Biochemicals ALX-804-717-C100; Pdgfra: células precursoras de oligodendrocitos, IF 1:500 APA5 BD Biosciences; Olig2: todas las células de linaje de oligodendrocitos, IHC 1:500, IF 1:1000; Millipore; O4: oligodendrocitos inmaduros, IF 1:1000 Millipore, MAB345; APC: oligodendrocitos, IHC 1:1000 Millipore CC-1 OP80; MBP: oligodendrocitos maduros, IHC 1:1000 Millipore MAB386; Ki67: células proliferantes, IHC, IF 1:500; WB 1:3000 Abcam ab66155; Pcn: células proliferantes, WB 1:2000; PC10 Cell signaling #2586; 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU): IHC 1:500; OBT0030 Accurate; caspasa activada 3: apoptosis, IHC, IF 1:500; Cell Signaling #9661; LC3B: autofagia, WB 1:1000; Novus NB600-1384; TUNEL: muerte celular, Roche In Situ Cell Death Detection Kit 11 684 795 910; Dcx: neuronas recién nacidas, IHC 1:1000; Cell Signaling #4604; NeuN: neuronas maduras, IHC, 1:500, Millipore, MAB377; Nestina: NSPC, IHC, IF 1:1000, Millipore MAB353; Sox2: NSPC, IHC, IF 1:500; WB 1:2000; Millipore AB5603; Gfap: NSPC y astrocitos, IHC, IF 1:1000; Millipore MAB360; Anticuerpos secundarios: Jackson ImmunoResearch anti-rata, anti-conejo, anti-ratón Cy3 (1:400), Alexa Fluor488 (1:200) y Alexa Fluor647 (1:200). Peroxidasa de rábano picante anti-conejo, anti-ratón (Invitrogen). FK866 (Hasmann & Schemainda, 2003) (Sigma F8557), EX527 (Peck et al, 2010) (Cayman Chemical 10009798), y AGK2 (Outeiro et al, 2007) (Sigma A8231) se disolvieron en DMSO y se usaron para inhibir Namp1, Sirt1 y Sirt2 respectivamente.

Cultivo de neuroesferas

Los cultivos de neuroesferas y los medios de cultivo se prepararon como se describe por Dasgupta & Gutmann, 2005 y Lu & Ramanan, 2012 con las siguientes modificaciones menores. En resumen, se diseccionaron los hipocampos postnatales en HibernataA (Invitrogen, A12475-01) y se tripsinizaron a 37 °C durante 7 m. Las células se disociaron mecánicamente por pipeteo y se sedimentaron por centrifugación (1700 rpm, 7 min). Se usó medio de disociación (bicarbonato de sodio al 0,1 %, HEPES 15 mM, glucosa al 0,5 % en HBSS) para lavar las células antes de que se

resuspendieran en medio de crecimiento. El medio de crecimiento consistió en DMEM:F12 (1:1, Invitrogen 11966-025 y 21700-075, respectivamente), B27 (Invitrogen, 17504-044), N2 (Invitrogen, 17502-048), Pen/Strep (Invitrogen), factor de crecimiento epidérmico (EGF, 20 ng/ml, Sigma, E4127), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, 10 ng/ml, R&D Systems, 233-fb) y heparina (Sigma). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con CO₂ al 5 % y se pasaron dos veces antes del uso en los experimentos. Se usaron de tres a nueve muestras independientes, cada una en 1 a 3 réplicas, de al menos dos camadas diferentes, en todos los experimentos. Las neuroesferas se cultivaron en el nivel de glucosa fisiológica de 5 mM (Dienel & Cruz, 2006), que se ha mostrado previamente que no tiene consecuencias negativas sobre la proliferación, diferenciación o muerte de NSPC (Fu et al, 2006; Gao & Gao, 2007).

10 Infección de neuroesferas

Las neuroesferas derivadas de ratones *Nampt^{flox/flox}* se infectaron con adenovirus que expresan Ad5 Cre recombinasa o b-galactosidasa (LacZ, control) a una MOI de 100. Todas las valoraciones se realizaron al menos 6 días después de la infección.

15 Análisis de proliferación de neuroesferas

Las neuroesferas derivadas de ratones *Nampt^{flox/flox}* se disociaron por digestión con tripsina y se sembraron a densidades celulares similares en placas de 24 pozos con medio de crecimiento fresco. Cada 24 horas, se recolectaron neuroesferas de pozos por triplicado, se disociaron y se contaron en un hemocitómetro usando exclusión de azul de tripano al 0,2 % para distinguir células viables. Para el análisis del diámetro de neuroesfera, se obtuvieron imágenes de la neuroesfera más grande en cada pozo (objetivo 20x) y se calculó el diámetro usando ImageJ. Para el análisis de neuroesferas secundarias, se contó el número total de neuroesferas en cada pozo a 7 días después de la colocación en placa.

25 Diferenciación de neuroesferas

Tres a cinco días después de su primer pasaje, las neuroesferas se tripsinizaron, se lavaron con medio de disociación y se colocaron en placas a 150.000 células por pozo en placas de 24 pozos en medio de diferenciación [medio de crecimiento sin FGF y EGF y con BDNF (5 ng/ml, Peprotech, 450-02) en cubreobjetos de vidrio revestidos con poli-D-lisina (50 ug/ml; Sigma) y laminina (20 ug/ml; BD Biosciences)]. Las placas de 6 pozos se revistieron con poli-D-lisina (20 ug/ml) y laminina (10 ug/ml). Para enriquecer los oligodendrocitos, se adicionó PDGF $\beta\beta$ (10 ng/ml, Peprotech 100-13A) a las neuroesferas en el pasaje 2 y se adicionaron PDGF $\beta\beta$ (2,5 ng/ml) y 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3, 40 ng/ml, Sigma T4397) al medio de diferenciación. El porcentaje de células precursoras de oligodendrocitos (OPC) generadas se analizó después de 2 días de diferenciación, y el porcentaje de oligodendrocitos diferenciados se analizó después de 6-7 días de diferenciación.

35 Análisis estadístico

Las diferencias entre los dos grupos se valoraron usando la prueba t no emparejada de Student. Las comparaciones entre varios grupos se realizaron usando ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Tukey-Kramer excepto para la figura 16J y figura 24D-E, en las cuales se usaron la prueba post-hoc de Games-Howell y la prueba post-hoc de Fisher LSD, respectivamente. Los valores de $P < 0,050$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los siguientes métodos son aplicables al ejemplo 15. Administración de NMN a través de agua potable y determinación de toxicidad y estabilidad de NMN

Se llevó a cabo un estudio de administración de NMN de 12 meses de duración usando ratones tipo silvestre bajo una condición de alimentación regular. Se administró NMN a través de agua potable, y se probaron dos dosis de NMN, 100 y 300 mg/kg de peso corporal/día. La estabilidad de NMN se examinó en agua potable y se encontró que NMN fue estable en solución. No se observó degradación significativa a temperatura ambiente. La ingesta de agua también se monitoreó muy cuidadosamente y la ingesta de agua no cambió significativamente durante el período experimental. Para valorar los efectos adversos beneficiosos y posibles de NMN, se monitorearon periódicamente una variedad de parámetros fisiológicos, incluido peso corporal, temperatura corporal, ingesta de alimentos y agua, niveles de glucosa en sangre con alimento y en ayunas, paneles de lípidos plasmáticos con alimentos y en ayunas, y tolerancia a glucosa e insulina, en ratones de control y administrados con NMN. También se verificaron la química sanguínea, conteos de células sanguíneas, prueba de tira de orina y otras pruebas fisiológicas, incluida prueba de actividad física. Con base en todas estas valoraciones, no se observaron efectos adversos, tal como desnutrición, o signos de toxicidad en ninguno de los grupos de 100 mg/kg o 300 mg/kg.

60 Ejemplos

Las presentes enseñanzas incluyen descripciones proporcionadas en los ejemplos que no se propone que limiten el alcance de ninguna reivindicación o aspecto. A menos que se presente específicamente en tiempo pasado, un ejemplo puede ser un ejemplo profético o real. Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente las presentes enseñanzas. Aquellos expertos en la técnica, a la luz de la presente divulgación, apreciarán que se pueden

realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aún obtienen un resultado similar o relacionado sin apartarse del espíritu y alcance de las presentes enseñanzas.

Ejemplo de referencia 1

Este ejemplo ilustra un efecto supresor de NMN sobre el incremento de peso corporal asociado con la edad.

En estos experimentos, se administró NMN a ratones a una tasa de dosis de 100 mg/kg por día o 300 mg/kg por día. NMN demostró un efecto supresor sobre el incremento de peso corporal asociado con la edad en un estudio de administración de NMN de 12 meses de duración. (Ver métodos; administración de NMN a través de agua potable y determinación de toxicidad y estabilidad de NMN). En estos experimentos, NMN demostró un efecto supresor sobre el incremento de peso corporal asociado a la edad (figura 2). Los resultados se analizaron con RANOVA bidireccional y RANOVA unidireccional con el término lineal no ponderado. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 15, 14 y 14 para los grupos de control, administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN).

El peso corporal promedio en cada grupo se muestra a lo largo de 0-12 meses. Hubo una interacción de manera estadísticamente alta significativa entre el tiempo y el grupo ($P < 0,001$ del RANOVA bidireccional), y los efectos lineales dependientes de dosis fueron estadísticamente significativos en todos los puntos de tiempo durante 4-12 meses ($P < 0,05$ del RANOVA unidireccional con el término lineal no ponderado). El por ciento de reducción de peso corporal promedio normalizado para los ratones de control fue 4 % y 9 % en los grupos de 100 y 300 mg/kg, respectivamente.

El efecto supresor de NMN sobre el incremento de peso corporal asociado con la edad se reconoció adicionalmente al calcular las ganancias de peso corporal en cada grupo (figura 3 0569). En la figura 3, se muestran las ganancias de peso corporal promedio en cada grupo durante 0-12 meses. Los resultados se analizaron con RANOVA bidireccional y RANOVA unidireccional con el término lineal no ponderado. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 15, 14 y 14 para los grupos de control, administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN). La interacción entre el tiempo y grupo fue de manera estadísticamente alta significativa ($P < 0,001$ del RANOVA bidireccional), y los efectos lineales dependientes de dosis fueron significativos en todos los puntos durante 2-12 meses ($P < 0,01$ del RANOVA unidireccional con el término lineal no ponderado). El número promedio de por ciento de supresión de ganancia de peso corporal normalizado para los ratones de control fue 12 % y 30 % en los grupos de 100 y 300 mg/kg, respectivamente.

Tomados en conjunto, estos resultados de este estudio de administración de NMN de 12 meses de duración demuestran que NMN puede suprimir el incremento de peso corporal asociado con la edad de una manera dependiente de la dosis, sin mostrar ningún efecto secundario grave durante todo el periodo experimental. Estos resultados demuestran que NMN se puede usar para el tratamiento, reducción o prevención de la obesidad asociada con la edad.

Ejemplo de referencia 2

Este ejemplo ilustra una mejora del metabolismo energético a lo largo de la edad con la administración de NMN.

En este estudio de administración de NMN a largo plazo (ver métodos; administración de NMN a través de agua potable y determinación de toxicidad y estabilidad de NMN), los inventores midieron el consumo de oxígeno, gasto energético y coeficiente respiratorio para ratones de control a los que se administraron 100 mg/kg de NMN por día y ratones a los que se administraron 300 mg/kg de NMN por día en el punto de tiempo de 12 meses usando el sistema de monitoreo de animales Oxyman Lab (Columbus Instruments, Columbus, OH).

La figura 4 muestra el consumo de oxígeno en ratones de control, administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN. Los datos se analizaron por la prueba de rango firmado de Wilcoxon. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 5 en cada grupo). *** $P < 0,001$. Como se ilustra en la figura 4, el consumo de oxígeno incrementó significativamente en los grupos de 100 mg/kg y 300 mg/kg cuando se examinó en los tiempos 0 a 27 ($P < 0,001$, prueba de rango firmado de Wilcoxon).

Las mediciones de gasto energético también mostraron incrementos significativos en los grupos de 100 mg/kg y 300 mg/kg durante 24 horas ($P < 0,001$, prueba de rango firmado de Wilcoxon) (figura 5). En la figura 5 se presenta el gasto energético en ratones de control, administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN. Los datos se analizaron por la prueba de rango firmado de Wilcoxon. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 5 en cada grupo). *** $P < 0,001$.

En la figura 6 se presenta el coeficiente respiratorio en ratones de control, administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN. Los datos se analizaron por la prueba de rango firmado de Wilcoxon. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 5 en cada grupo). *** $P < 0,001$. El coeficiente respiratorio disminuyó significativamente en ambos grupos ($P < 0,001$, prueba de rango firmado de Wilcoxon) (figura 6 0569). Sin que se limite por teoría, estos resultados sugieren que NMN incrementa el gasto energético al cambiar su principal fuente de energía de la glucosa a los ácidos grasos, incrementando de este modo la oxidación de ácidos grasos. Sin que se limite por teoría, este fenómeno puede proporcionar una explicación para el efecto supresor de NMN sobre el incremento de peso corporal asociado con la edad.

Ejemplo de referencia 3

Este ejemplo ilustra un efecto supresor de NMN sobre los incrementos asociados con la edad en los niveles de lípidos en sangre.

5 Los niveles en sangre de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres se muestran durante 12 meses en el control y las cohortes administradas con 100 y 300 mg/kg de NMN en la figura 7. Los resultados se analizaron con RANOVA bidireccional y RANOVA unidireccional. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 25 para cada grupo).

10 Los niveles en sangre de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres se muestran durante 12 meses en el control y las cohortes administradas con 100 y 300 mg/kg de NMN. Los resultados se analizaron con RANOVA bidireccional y RANOVA unidireccional. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 25 para cada grupo).

15 En la cohorte de control de un estudio de NMN a largo plazo (ver métodos; administración de NMN a través de agua potable y determinación de toxicidad y estabilidad de NMN), los niveles en sangre de colesterol mostraron incrementos constantes con el paso del tiempo, en tanto que los niveles en sangre de triglicéridos y ácidos grasos libres (FFA) alcanzaron su pico en el punto de tiempo de 6 meses y entonces disminuyeron. Sin embargo, en ambos grupos de 100 y 300 mg/kg, estos incrementos con la edad en el colesterol y ácidos grasos libres tendieron a ser suprimidos (figura 7A-C). En particular, la interacción entre el tiempo y grupo fue de manera estadísticamente alta significativa para FFA (P = 0,003 del RANOVA bidireccional), y el grupo de 300 mg/kg no mostró ningún incremento estadísticamente significativo con el paso del tiempo, en tanto que los grupos de control y de 100 mg/kg mostraron incrementos estadísticamente significativos durante 12 meses y los primeros 6 meses, respectivamente (P < 0,05 de las pruebas de los efectos dentro de los sujetos en el RANOVA unidireccional). Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 25 para cada grupo). Aunque el nivel promedio de ácidos grasos libres en el punto de tiempo de 0 meses en el grupo de 300 mg/kg fue significativamente mayor que aquellos en los otros dos grupos, NMN a la dosis de 300 mg/kg suprimió los incrementos asociados con la edad en los niveles en sangre de FFA, particularmente en el punto de tiempo de 6 meses (P < 0,05 del ANOVA unidireccional con la prueba post-hoc de Dunnett T3). Por lo tanto, NMN es capaz de suprimir los incrementos asociados con la edad en los niveles de lípidos en sangre, particularmente los niveles de FFA en sangre.

30 Sin que se limite por teoría, puesto que NMN tiene un efecto de supresión del incremento de peso corporal asociado con la edad, se planteó la hipótesis de que el efecto de NMN sobre los niveles de lípidos en sangre se puede deber a la reducción en el peso corporal. Para abordar esta posibilidad, se compararon los niveles de lípidos entre ratones individuales cuyos pesos corporales promedio se emparejaron a través de cohortes de control y experimentales. Los niveles en sangre emparejados con el peso corporal de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres se muestran durante 12 meses en el control y las cohortes administradas con 100 y 300 mg/kg de NMN en la figura 8. Los resultados se analizaron con RANOVA bidireccional y RANOVA unidireccional. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 10-15 para cada grupo). Después de emparejar el peso corporal, los niveles de colesterol en sangre se volvieron muy similares a través de los grupos de control y experimentales, en tanto que los niveles de FFA fueron aún más bajos en los grupos de 100 y 300 mg/kg en comparación con aquellos del grupo de control (figura 8A-C). Incluso después de la coincidencia de peso corporal, la interacción entre el tiempo y el grupo fue aún estadísticamente alta significativa para FFA (P = 0,007 del RANOVA bidireccional), y nuevamente, el grupo de 300 mg/kg no mostró ningún incremento estadísticamente significativo con el paso del tiempo, en tanto que los grupos de control y de 100 mg/kg mostraron incrementos significativos con el paso del tiempo (P < 0,01 de las pruebas de los efectos dentro de los sujetos en el RANOVA unidireccional). Los niveles de FFA en sangre tendieron a ser más bajos en los grupos de 100 mg/kg y 300 mg/kg en comparación con aquellos en el grupo de control después del punto de tiempo de 6 meses, aunque las diferencias no alcanzaron significancia estadística (figura 8C). Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 10-15 para cada grupo). Estos descubrimientos indican que NMN tiene el efecto de suprimir el incremento asociado con la edad en los niveles de FFA en sangre, independientemente de la reducción en el peso corporal. Sin que se limite por teoría, el efecto de NMN sobre los niveles de colesterol en sangre puede ser secundario al efecto de supresión del incremento de peso corporal asociado con la edad.

50 Se ha reportado que el tratamiento crónico con ácido nicotínico tiende a incrementar los niveles de FFA en sangre, en tanto que reduce los niveles de triglicéridos y colesterol total (Wang, W., et al. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279: E50-E59, 2000). Como se muestra en la presente, NMN tiene la capacidad de suprimir el incremento asociado con la edad en los niveles de FFA en sangre, que distingue NMN del ácido nicotínico. NMN también es capaz de reducir los niveles de colesterol a través de la supresión del incremento de peso corporal asociado con la edad. En tanto que la administración crónica de ácido nicotínico puede provocar resistencia a la insulina de músculo esquelético (Fraterrigo, G., et al. Cardioresnal. Med. 2: 211-7, 2012), NMN no muestra ningún efecto adverso sobre el metabolismo de glucosa. Por lo tanto, la administración de NMN puede ser una intervención efectiva para suprimir los incrementos asociados con la edad en los niveles de lípidos en sangre.

60 Ejemplo de referencia 4

Este ejemplo ilustra que la administración de NMN mejora la sensibilidad a la insulina en individuos de edad avanzada.

65 En estas investigaciones, la sensibilidad a la insulina, valorada por la prueba de tolerancia a la insulina, mostró diferencias significativas entre el control y los grupos administrados con 100 mg/kg y 300 mg/kg de NMN después del punto de tiempo

de 12 meses. (Ver métodos; administración de NMN a través de agua potable y determinación de toxicidad y estabilidad de NMN). Como se ilustra en la figura 9, se presentan los resultados de tolerancia a la insulina de ratones emparejados en peso corporal en el control y los grupos administrados con 100 y 300 mg/kg de NMN en el punto de tiempo de 12 meses. Se muestran los niveles de glucosa en sangre (A) y los cambios porcentuales de glucosa (B) después de la inyección de insulina. Los resultados se analizaron con RANOVA bidireccional y ANOVA unidireccional. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 10-15 para cada grupo).

En estos experimentos, el último punto de tiempo medido cuando los ratones alcanzaron 17 meses de edad, los ratones emparejados en peso corporal, administrados con NMN mostraron sensibilidad a la insulina significativamente mejorada en comparación con el grupo de control emparejado en peso corporal (figura 9A). Hubo una interacción estadísticamente significativa entre el tiempo y grupo (P = 0,023 de la prueba de Greenhouse-Geisser en RANOVA bidireccional), y los efectos lineales dependientes de dosis fueron estadísticamente significativos o cercanos a la significancia en los puntos de tiempo de 30 min y 45 min, respectivamente (P = 0,026 y P = 0,061 en el ANOVA unidireccional con término lineal no ponderado). Los resultados se analizaron con RANOVA bidireccional y ANOVA unidireccional. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 10-15 para cada grupo). Esta sensibilidad a la insulina mejorada en los grupos de 100 mg/kg y 300 mg/kg se reconoció adicionalmente cuando se grafican los cambios porcentuales de glucosa (figura 9B), aunque la interacción entre el tiempo y el grupo no alcanzó significancia estadística en esta valoración (P = 0,091 de la prueba de Greenhouse-Geisser en RANOVA bidireccional). La administración de NMN a largo plazo puede mejorar la sensibilidad a la insulina en ratones viejos, que indica que la administración de NMN es una intervención efectiva anti-envejecimiento para mantener una mejor sensibilidad a la insulina en los ancianos.

Ejemplo de referencia 5

Este ejemplo ilustra la mejora de la función de memoria bajo una dieta alta en grasas (HFD) por administración de NMN. (Ver métodos; estudio de función de memoria)

La figura 10 ilustra las respuestas de congelación de ratones tratados con NMN, de control alimentados con comida normal, alimentados con HFD y alimentados con HFD en pruebas de acondicionamiento miedo contextual y con claves en el día 1, día 2 y día 3. NMN se administró a la dosis de 300 mg/kg/día durante 4 meses. En el día 1 del estudio, a los ratones se les dio una señal auditiva y entonces una descarga eléctrica leve en el pie, y se analizó individualmente un tiempo de congelación. En el día 2, los ratones entrenados se colocaron en una cámara de entrenamiento sin señales de tono, y se evaluaron sus respuestas de congelación. En el día 3, se probó el condicionamiento de miedo con señales, que no implica el hipocampo, dando la misma señal de tono usada en la sesión de acondicionamiento (día 1) y analizando sus respuestas de congelación. Los ratones alimentados con HFD mostraron un deterioro del condicionamiento de miedo contextual en el día 2 en comparación con los ratones de control alimentados con comida normal, pero no mostraron ningún defecto en la sesión de acondicionamiento en el día 1 y la prueba de acondicionamiento de miedo con señales en el día 3 (figura 10), demostrando que HFD afecta específicamente la función de memoria dependiente del hipocampo. Los ratones alimentados con HFD tratados con NMN demostraron respuestas de congelación indistinguibles de aquellas de los ratones de control alimentados con comida normal en la prueba de acondicionamiento de miedo contextual en el día 2. Sus respuestas de congelación no difirieron de aquellas de los ratones de control tanto en el día 1 como en el día 3. Estos resultados demuestran que la administración de 4 meses de NMN en ratones puede restaurar la función de memoria dependiente de hipocampo normal incluso bajo una condición alimentada con HFD. NMN se administró a la dosis de 300 mg/kg/día durante 4 meses. Los resultados se analizaron por ANOVA unidireccional con un término cuadrático no ponderado. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM (n = 17, 15 y 12 para ratones tratados con NMN, alimentados con HFD, de control alimentados con comida normal y alimentados con HFD, respectivamente). ** P < 0,01; * P < 0,05. Estos resultados demuestran que la administración de 4 meses de NMN en ratones puede restaurar la función de memoria dependiente de hipocampo normal incluso bajo una condición alimentada con HFD.

Ejemplo de referencia 6

Este ejemplo ilustra la mejora de la función de células fotorreceptoras de retina con la edad.

En el estudio de administración de NMN a largo plazo (ver métodos; administración de NMN a través de agua potable y determinación de toxicidad y estabilidad de NMN), se evaluó la función de retina por biomicroscopía de fondo y electrorretinografía (ERG). La figura 11 ilustra imágenes de biomicroscopía de fondo de ratones de control y administrados con NMN. Para cada grupo, se examinaron cinco ratones y se muestran dos imágenes representativas.

Los depósitos blanquecinos intrarretinales se redujeron drásticamente en ratones administrados con NMN. En la biomicroscopía de fondo, los cinco ratones de control a los 18 meses de edad mostraron muchos depósitos blanquecinos intrarretinianos, en tanto que dos y cuatro de cada cinco ratones a dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg, respectivamente, mostraron reducciones dramáticas en estos depósitos, que sugiere que los cambios patológicos asociados con la edad en la retina se suprimen por NMN (figura 11).

La figura 12 ilustra electrorretinogramas de ratones de control y administrados con NMN. Se muestran las amplitudes de las ondas escotópicas a y b (A, B) y fotópica b (C) en cada intervalo de estímulo. Consistentemente, en el análisis ERG, hubo una interacción significativa entre el estímulo y el grupo (P = 0,009 del RANOVA bidireccional) para la onda

escotópica a, y los ratones administrados con NMN mostraron amplitudes significativamente mayores a 0 y 5 db ($P = 0,035$ y $0,022$ para el grupo de 300 mg/kg a 0 y 5 db, respectivamente; $P = 0,009$ para el grupo de 100 mg/kg a 5 db de la prueba de Dunnett T3 en el RANOVA unidireccional dentro de los grupos), que demuestra que NMN es capaz de mejorar la función de células de bastón en ratones envejecidos (figura 12A). Los datos se analizaron con el ANOVA repetido bidireccional. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM. $*p < 0,05$; $p \leq 0,01$.

Aunque no hubo interacciones significativas entre el estímulo y el grupo para las ondas escotópica b y fotópica b, pareció haber una tendencia de mejora para la onda fotópica b, que representa la función de células cónicas, a través de todo un intervalo de estímulo en los grupos de 100 y 300 mg/kg (figura 12B y 12C). Los datos se analizaron con el ANOVA repetido bidireccional. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM. $*p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$. En conjunto, estos descubrimientos indican que NMN es capaz de mejorar la función de células fotorreceptoras de retina en ratones envejecidos.

Los presentes inventores valoraron la importancia fisiológica de la biosíntesis de NAD mediada por NAMPT en la retina al generar ratones de inactivación NAMPT específicos de células de bastón y células cónicas. En la biomicroscopía de fondo, los ratones de inactivación NAMPT específicos de células cónicas tuvieron una apariencia atrófica en la cabeza de nervio óptico, depósitos blanquecinos intrarretinianos y revestimiento perivascular, en tanto que los animales de control compañeros de camada fueron normales. ERG demostró una disminución significativa y dramática en las amplitudes de onda escotópica b y fotópica b en comparación con los ratones de control de compañero de camada. Las amplitudes de onda escotópica a en los ratones de inactivación NAMPT específicos de células cónicas disminuyeron significativamente pero en menor medida que las respuestas de onda fotópica b. Además, los ratones de inactivación NAMPT específicos de células de bastón mostraron degeneración de retina total. Las respuestas de ERG de onda a y b se redujeron completamente como se caracteriza por una falta total de respuesta a todos los estímulos. Además, el tratamiento de la línea de células cónicas 661W derivada de fotorreceptores de ratón con FK866, un potente inhibidor de NAMPT, condujo a muerte celular apoptótica. La adición de NMN al medio de cultivo rescató de manera exitosa células 661W de la muerte celular mediada por FK866, que sugiere que la deficiencia de NAD provoca la muerte celular observada. Estos resultados indican que la inhibición de la biosíntesis de NAD mediada por NAMPT por medio genético y farmacológico conduce a la muerte de células fotorreceptoras y finalmente, a la degeneración de retina. La administración de NMN es una intervención efectiva para tratar/prevenir la degeneración de retina.

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la mejora de la producción de lágrimas con la edad usando prueba de Schirmer modificada.

En este estudio de administración de NMN a largo plazo (ver métodos; administración de NMN a través de agua potable y determinación de toxicidad y estabilidad de NMN), se valoró la producción de lágrimas en ratones de control y administrados con NMN con prueba de Schirmer modificada. Todos los valores se presentan como media $\pm$ SEM. $**p < 0,01$. NMN incrementó la producción de lágrimas de una manera dependiente de la dosis en ratones de 18 meses de edad (figura 13). La producción de lágrimas observada en el grupo de 300 mg/kg fue comparable a la producción máxima de lágrimas durante el tiempo vida del ratón. Estos descubrimientos indican que la administración de NMN es capaz de incrementar significativamente la producción de lágrimas en ratones envejecidos, proporcionando una intervención efectiva para proteger la función ocular de las enfermedades de ojo seco.

Ejemplo de referencia 8

Este ejemplo ilustra que los niveles de NAD⁺ en el hipocampo y la expresión de Nampt disminuyen con la edad.

Los inventores plantearon la hipótesis de que el envejecimiento puede reducir la biosíntesis de NAD⁺ mediada por Nampt en el cerebro, particularmente en el hipocampo, que afecta a la función de las NSPC. Los inventores primero midieron los niveles de NAD⁺ en hipocampos aislados de ratones C57Bl6 de 1, 3-4, 6 y 10-12 meses de edad. La figura 14 ilustra los niveles de NAD⁺ en el hipocampo y la expresión de Nampt disminuyendo con la edad. A) Biosíntesis de NAD⁺ a partir de nicotinamida. La nicotinamida fosforribosiltransferasa (Nampt) convierte la nicotinamida y 5'-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) en mononucleótido de nicotinamida (NMN). La nicotinamida/mononucleótido de ácido nicotínico adenililtransferasa (NMNAT) convierte NMN y adenosina-5'-trifosfato (ATP) en NAD⁺. En tanto que NAD⁺ se usa comúnmente en reacciones redox, las células requieren principalmente NAD⁺ como co-sustrato para varias familias de enzimas, una de las cuales es la familia de sirtuina de las proteínas desacetilasas. La familia de sirtuina incluye Sirt1 y Sirt2, que escinden NAD⁺ en su enlace glicosídico, liberando ADP-ribosa (Stein & Imai, 2012). Se indican los inhibidores usados en experimentos posteriores. B) Análisis por HPLC de los niveles de NAD⁺ en extractos de hipocampo (1 mes, $n = 5$; 3-4 meses, $n = 16$; 6 meses, $n = 10$; 10-12 meses, $n = 28$). C-D) Cuantificación de inmunofluorescencia para Nampt en la zona subgranular (SGZ). Medición de los niveles umbrales de inmunorreactividad de Nampt (C) y el número de células Nampt⁺ altamente inmunorreactivas (D) a lo largo de la SGZ ($n = 5$). E) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Dapi (azul original) y Nampt (rojo original) en la SGZ en ratones jóvenes (6 meses de edad) y viejos (18 meses de edad). Las barras de escala denotan 20 μ m. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. $*P < 0,05$. $**P < 0,01$. $***P < 0,001$.

Los niveles de NAD⁺ disminuyeron gradualmente con la edad, alcanzando 63 % en ratones de 10-12 meses de edad en comparación con los de ratones de 1 mes de edad (figura 14B). De acuerdo con este descubrimiento, la cuantificación de

la inmunorreactividad de Nampt en la SGZ del DG tanto por un nivel umbral de intensidad de Nampt como por un conteo del número de células Nampt+ umbral demostró que los ratones de 18 meses de edad exhiben 52-66 % de la inmunorreactividad de Nampt presente en ratones de 6 meses de edad (figura 14C-E). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001. Sin que se limite por teoría, estos resultados sugieren que la biosíntesis de NAD+ mediada por Nampt en el hipocampo disminuye con la edad en un curso de tiempo similar al de la proliferación de NSPC.

Ejemplo de referencia 9

Este ejemplo ilustra que Nampt se expresa en una subpoblación de NSPC de SGZ.

Se ha reportado que Nampt se expresa predominantemente en neuronas de hipocampo pero no en astrocitos estrellados (Wang et al, 2011a; Zhang et al, 2010). De acuerdo con este descubrimiento, la inmunohistoquímica para Nampt y los marcadores específicos de tipo de célula revelaron casi todas las neuronas NeuN+ en la capa de gránulos del Nampt expresado por DG, en tanto que casi ninguna célula glial S100 β + lo hizo (figura 22A-E).

Sin embargo, los inventores también notaron que muchas células inmunorreactivas Nampt a lo largo de la SGZ del DG no expresaban NeuN (figura 22B-22E). Los inventores realizaron co-inmunohistoquímica para marcadores de NSPC (Sox2+, Gfap+ radial), y encontraron que una población significativa de las NSPC expresó Nampt (Figura 2A-B 0596). La figura 22 ilustra que Nampt se expresa en una subpoblación de NSPC de SGZ. A-C) Imágenes representativas de fluorescencia para marcadores Dapi (azul original), Nampt (rojo original) y NSPC (Sox2, Gfap y Nestina-GFP 3 días después de la inyección de tamoxifeno; verde original) en la SGZ. Las líneas punteadas denotan la SGZ. Las flechas individuales indican ejemplos de colocalización. Las flechas dobles indican ejemplos de no-colocalización. Las barras de escala denotan 10 μ m. D) Cuantificación de los porcentajes de células positivas para marcador de NSPC en la SGZ que también expresan Nampt en ratones de 3 a 6 meses de edad. Al menos 350 células de 7-14 ratones se valoraron por grupo. E) Una inmunotransferencia representativa y cuantificación de inmunotransferencias para Nampt normalizadas por actina en neuroesferas cultivadas de ratones postnatales (n = 6 muestras independientes, 16 réplicas), así como extractos de tejido de hipocampo (HC) aislados de ratones ya sea postnatales (n = 12) o adultos (n = 12). F) Se estableció un umbral de inmunorreactividad de Nampt y se valoró el número de células Nampt+ altamente inmunorreactivas a lo largo de la SGZ para colocalización con el marcador neuronal NeuN o el marcador de NSPC Sox2 en la zona subgranular (SGZ, n = 5). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001 (figura 15A-B).

Para valorar la colocalización *in vivo* entre Nampt y Nestina, los inventores cruzaron ratones que expresan Cre recombinasa bajo el promotor de Nestina (Nestina-CreERT2) con una cepa de ratón indicadora de GFP que expresa un casete STOP flanqueado por loxP que evita la transcripción de la GFP mejorada corriente abajo (véase métodos), generando ratones iNSPC-GFP. Nampt también se colocalizó con GFP impulsada por el promotor de Nestina (NestinaGFP, figura 15C).

La cuantificación de estas observaciones reveló que a lo largo de la SGZ, 32 % de las células Sox2+, 55 % de las células Gfap + radiales y 78 % de las células NestinaGFP+ expresaron Nampt (figura 15D y tabla 2). Además, las células Ki67+ y Olig2+ a lo largo de la SGZ también expresaron Nampt (tabla 3, figura 22H-22I). Separado de las poblaciones de células localizadas en SGZ, 3 $\pm$ 1 % de las células NestinaGFP+ tuvieron una expresión de GFP extremadamente fuerte, se localizaron en la capa de gránulos y expresaron NeuN, probablemente debido a la proteína CreERT2 residual que quedó en la progenie de las NSPC previamente diferenciadas. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. ***P < 0,001.

Tabla 2

50 rutas principales disminuidas de forma regulada				
Ruta	Miembros	Cambiado	Relación Z	Valor p
NUCLEAR PART	579	468	-7,07	0,000
DNA METABOLIC PROCESS	257	226	-6,49	0,000
DNA REPLICATION	102	85	-6,20	0,000
DNA DEPENDENT DNA REPLICATION	56	46	-6,07	0,000
DNA REPAIR	125	111	-5,98	0,000
NÚCLEO	1433	1169	-5,95	0,000
INTRACELLULAR ORGANELLE PART	1192	988	-5,85	0,000
RESPONSE TO DNA DAMAGE STIMULUS	162	138	-5,80	0,000
ORGANELLE PART	1197	992	-5,72	0,000
NUCLEOBASE_NUCLEOSIDE_NUCLEOTIDE_AND_NUCLEIC ACID	1246	1051	-5,34	0,000
ORGANELLE LUMEN	458	372	-5,04	0,000
MEMBRANE ENCLOSED LUMEN	458	372	-5,04	0,000
CROMOSOMA	124	106	-4,75	0,000

CELL_CYCLE_PROCESS	193	167	-4,75	0,000
NUCLEAR_LUMEN	387	310	-4,74	0,000
CELL_CYCLE_GO_0007049	315	268	-4,63	0,000
RNA_PROCESSING	174	145	-4,32	0,000
BASE_EXCISION_REPAIR	17	15	-4,30	0,000
CELL_CYCLE_PHASE	170	147	-4,23	0,000
RESPONSE_TO_ENDOGENOUS_STIMULUS	200	168	-4,18	0,000
MACROMOLECULAR_COMPLEX	945	793	-4,14	0,000
NUCLEAR_CHROMOSOME	54	45	-4,11	0,000
STRUCTURE_SPECIFIC_DNA_BINDING	56	45	-4,08	0,000
DOUBLE_STRANDED_DNA_BINDING	32	26	-3,95	0,000
CELL_CYCLE_CHECKPOINT_GO_0000075	48	38	-3,92	0,000
TRNA_METABOLIC_PROCESS	19	18	-3,76	0,000
DNA_RECOMBINATION	47	45	-3,69	0,000
M_PHASE	114	100	-3,67	0,000
HYDROLASE_ACTIVITY_HYDROLYZING_N_GLYCOSYL_C OMPOUNDS	10	10	-3,63	0,000
NUCLEOPLASMA	279	230	-3,62	0,000
REPLICATION_FORK	18	16	-3,60	0,000
CONDENSED_CHROMOSOME	34	27	-3,57	0,000
TRNA_PROCESSING	10	9	-3,51	0,000
RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX	143	116	-3,49	0,000
MITOTIC_CELL_CYCLE	153	133	-3,48	0,001
CHROMOSOMAL_PART	96	83	-3,48	0,001
NÚCLEO	126	97	-3,47	0,001
NON_MEMBRANE_BOUND_ORGANELLE	632	513	-3,46	0,001
INTRACELLULAR_NON_MEMBRANE_BOUND_ORGANELL E	632	513	-3,46	0,001
RNA_BINDING	259	211	-3,44	0,001
TRANSFERASE_ACTIVITY_TRANSFERRING_ONE_ CARBON_GROUPS	37	34	-3,37	0,001
CONDENSED_NUCLEAR_CHROMOSOME	18	15	-3,36	0,001
NUCLEOBASE_NUCLEOSIDE_AND_NUCLEOTIDE_ METABOLIC_PROCE SS	52	45	-3,35	0,001
METHYLTRANSFERASE_ACTIVITY	36	33	-3,30	0,001
INTERPHASE	68	57	-3,28	0,001
NUCLEOTIDE_METABOLIC_PROCESS	42	36	-3,21	0,001
DNA_INTEGRITY_CHECKPOINT	24	16	-3,20	0,001
SINGLE_STRANDED_DNA_BINDING	35	27	-3,17	0,002
PROTEIN_COMPLEX	816	689	-3,08	0,002
INTERPHASE_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	62	52	-3,07	0,002

Tabla 3

50 rutas principales disminuidas de forma regulada				
Ruta	Miembros	Cambiado	Relación Z	Valor p
SYSTEM_DEVELOPMENT	863	759	4,69	0,000
MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT	1051	910	4,64	0,000
SIALYLTRANSFERASE_ACTIVITY	10	10	1,61	0,000
PHOSPHOINOSITIDE_BINDING	20	13	4,49	0,000
ANATOMICAL_STRUCTURE_DEVELOPMENT	1017	891	4,47	0,000
ORGAN_DEVELOPMENT	572	499	4,28	0,000
RECEPTOR_BINDING	378	321	4,25	0,000
EXTRACELLULAR_REGION	448	374	4,10	0,000
ENZYME_LINKED_RECEPTOR_PROTEIN_SIGNALING_PA THWAY	140	126	4,05	0,000
Crecimiento	77	63	3,85	0,000
NEGATIVE_REGULATION_OF_GROWTH	40	34	3,84	0,000
FOCAL_ADHESION_FORMATION	10	9	3,83	0,000
OLIGOSACCHARIDE_METABOLIC_PROCESS	11	11	3,82	0,000
EXTRACELLULAR_REGION_PART	339	283	3,82	0,000
REGULATION_OF_SIGNAL_TRANSDUCTION	223	189	3,77	0,000

SYSTEM PROCESS	563	489	3,74	0,000
EXTRACELLULAR SPACE	246	204	3,66	0,000
NEURON PROJECTION	21	18	3,62	0,000
INTERMEDIATE FILAMENT CYTOSKELETON	24	22	3,61	0,000
INTERMEDIATE FILAMENT	24	22	3,61	0,000
SENSORY PERCEPTION	190	159	3,57	0,000
MEMBRANA	1998	1678	3,55	0,000
POSITIVE REGULATION OF SECRETION	20	15	3,51	0,000
REGULATION OF CELL GROWTH	46	38	3,49	0,000
REGULATION OF GROWTH	58	49	3,48	0,000
SIGNAL TRANSDUCTION	1637	1394	3,47	0,001
PLASMA MEMBRANE	1429	1199	3,46	0,001
MESODERM DEVELOPMENT	22	17	3,45	0,001
CELL DEVELOPMENT	579	512	3,44	0,001
FOCAL ADHESION	13	10	3,44	0,001
ANATOMICAL STRUCTURE MORPHOGENESIS	379	335	3,39	0,001
NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT	386	342	3,39	0,001
EARLY ENDOSOME	18	15	3,37	0,001
CYTOSKELETAL PROTEIN BINDING	159	137	3,36	0,001
TASTE RECEPTOR ACTIVITY	15	3	3,36	0,001
AXON GUIDANCE	22	19	3,34	0,001
GENERATION OF NEURONS	83	76	3,34	0,001
CELL JUNCTION	83	67	3,29	0,001
LIPID HOMEOSTASIS	16	12	3,28	0,001
PDZ DOMAIN BINDING	14	13	3,26	0,001
LIGAND DEPENDENT NUCLEAR RECEPTOR ACTIVITY	25	23	3,26	0,001
NEUROGÉNESIS	93	84	3,21	0,001
CELL MATRIX JUNCTION	18	14	3,20	0,001
VACÚOLA	69	56	3,19	0,001
IDENTICAL PROTEIN BINDING	305	253	3,19	0,001
CELL MATRIX ADHESION	38	34	3,18	0,001
TRANSMEMBRANE RECEPTOR PROTEIN TYROSINE KINASE SIGNALING PATH	83	75	3,18	0,001
ACTIN FILAMENT BASED PROCESS	116	96	3,18	0,001
CELL SURFACE RECEPTOR LINKED SIGNAL TRANSDUCTION GO 000166	642	547	3,17	0,002
CELL SUBSTRATE ADHERENS JUNCTION	16	13	3,17	0,002

Para confirmar que Nampt se expresa altamente en las NSPC, los inventores cultivaron las NSPC de los hipocampos de crías postnatales como neuroesferas. Las neuroesferas mostraron niveles de expresión de Nampt 22 o 32 % más altos que los extractos de hipocampo completos tomados de ratones postnatales (P12) o adultos (2,5-4,5 meses), respectivamente (figura 15E), que indica que las NSPC tienen niveles de expresión de Nampt más altos en comparación con otros tipos de células de hipocampo. Sin que se limite por teoría, estos resultados sugieren que Nampt se expresa en una gran subpoblación de NSPC.

Los inventores pusieron umbral a la inmunorreactividad de Nampt y valoraron las células Nampt+ umbrales para la colocalización con el marcador neuronal NeuN y el marcador de NSPC Sox2 para determinar qué poblaciones de células pierden la expresión de Nampt con la edad. Con la edad, el porcentaje de células intensamente inmunorreactivas de Nampt que colocalizaron con NeuN incrementó ligeramente, en tanto que el porcentaje de células intensamente inmunorreactivas de Nampt que colocalizaron con Sox2 disminuyó de 21 % a 4 % (figura 15F). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001. De manera similar, en la SGZ, el porcentaje de NeuN+ que expresó Nampt incrementó con la edad, en tanto que el porcentaje de células Sox2+ que expresaron Nampt disminuyó (figura 22E, tabla 2). Por lo tanto, al menos parte de la disminución en la expresión de Nampt en la SGZ con la edad se debe a la pérdida de las NSPC Sox2+.

Ejemplo de referencia 10

Este ejemplo ilustra que la delección específica de NSPC adultas de Nampt altera la auto-renovación de NSPC *in vivo*.

Los inventores investigaron si la inactivación de Nampt específicamente en las NSPC adultas puede recapitular cambios fenotípicos asociados con la edad en la funcionalidad de NSPC *in vivo*. Los inventores generaron ratones de inactivación *Nampt* inducibles específicos de NSPC adultas al cruzar ratones *Nampt^{fllox/flox}* (Rongvaux et al, 2008) con ratones Nestina-CreERT2 (ratones iNSPC-Nampt- KO). Para rastrear la progenie de las NSPC adultas en las cuales se inactivó Nampt y confirmar la especificidad y magnitud de la delección inducida por tamoxifeno, los inventores también cruzaron ratones

iNSPC-Nampt-KO con los ratones iNSPC-GFP mencionados anteriormente. Después de la inyección de tamoxifeno, estos ratones expresaron NestinaGFP en la SGZ y SVZ pero no en regiones no neurogénicas del cerebro tal como el cuerpo calloso o corteza (figura 23A-B).

La inmunohistoquímica y PCR de recombinación para NestinaGFP confirmaron que hubo recombinación indetectable presente en ratones inyectados con vehículo. La banda de ~350 pares de bases confirma la delección de los exones 5 y 6. La banda de 1.800 pares de bases corresponde a un gen Nampt con una secuencia de exón 5 a 6 de longitud completa. (figuras 23A, 23C) Para verificar que la población NestinaGFP+ consistió en las NSPC, los inventores co-tifieron los marcadores de NSPC Sox2 y Gfap. El 61 % de las células Sox2+ y 34 % de las células Gfap + radiales coexpresaron NestinaGFP 7 días después del tamoxifeno (figura 23D). Los inventores también verificaron la eficacia de delección de Nampt al cuantificar el porcentaje de células NestinaGFP+ que expresaban Nampt 3 y 7 días después de la inyección de tamoxifeno. A los 3 días después de la inyección de tamoxifeno, el porcentaje de células NestinaGFP+ que expresaron Nampt en ratones iNSPC-Nampt-KO fue 40 % menor que los controles de compañeros de camada, y a los 7 días después de la inyección de tamoxifeno, el porcentaje de células NestinaGFP+ que expresaron Nampt se redujo por 62 % (figura 23E).

Para valorar el efecto acumulativo de la pérdida de Nampt sobre la proliferación de NSPC, los inventores eliminaron *Nampt* en ratones iNSPC-Nampt-KO a las 6 semanas de edad con 3 rondas de 5 días consecutivos de inyecciones de tamoxifeno, separadas por 6 semanas (Figura 16A). El análisis paramétrico del enriquecimiento génico (PAGE) se llevó a cabo con base en análisis de microarreglo. Ver sección de métodos. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001. Los inventores entonces valoraron los ratones de control e iNSPC-Nampt-KO para la expresión de marcadores específicos de linaje por inmunohistoquímica (figura 16C). En ratones iNSPC-Nampt-KO, los inventores encontraron que la mezcla de NSPC Nestina+ disminuyó por 49 % en el DG (figura 16C). La incorporación de BrdU y la población de células proliferantes [Ki67+ (von Bohlen und Halbach, 2011)] también disminuyeron por 22 % y 35 %, respectivamente (figura 16D-16E). De acuerdo con este defecto en la mezcla de NSPC y la proliferación, la mezcla de neuronas recién nacidas [doblecortina, Dcx+, (von Bohlen und Halbach, 2011)] también disminuyó significativamente por 26 % (figura 16F-16G). En contraste, los inventores no observaron ninguna diferencia significativa en la maduración de las neuronas recién nacidas (figura 23F). Las células inmaduras no tuvieron o proyecciones horizontales. Las células maduras tuvieron proyecciones verticales que abarcaban la capa de células granulares. Se tuvo acceso a la supervivencia de NSPC/células hijas por inmunotinción para caspasa 3 activada. Solo se observaron células de caspasa 3+ activada raras en regiones tanto neurogénicas como no neurogénicas del cerebro (figura 23A-23B), y estas células de caspasa 3+ activada nunca se observaron en células GFP+ en iNSPC-Nampt-KO DG, sin estar limitadas por teoría, proporcionando evidencia contra una contribución potencial de muerte celular a los efectos observados.

Para valorar el efecto agudo de la pérdida de Nampt sobre las decisiones de destino de NSPC, los inventores indujeron la delección de Nampt a las 6 semanas de edad con 4 inyecciones de tamoxifeno totales seguidas de sacrificio 72 horas después de la primera inyección (figura 16H). Para facilitar la valoración de la diferenciación, las células divisoras se etiquetaron al inyectar a los ratones con BrdU simultáneamente con el primer día de tratamiento con tamoxifeno. 4 inyecciones de TAM totales (2 inyecciones en el primer día acopladas con BrdU a 100 mg/kg de peso corporal, así como 2 inyecciones totales en los 2 días posteriores). Los ratones iNSPC-Nampt-KO mostraron niveles significativamente reducidos de colocalización de BrdU con células Nestin+ radiales (figura 16I), sin estar limitados por teoría, que sugiere decisiones de auto-renovación disminuidas. Sin embargo, los ratones iNSPC-Nampt-KO mostraron niveles normales de colocalización de BrdU con marcadores neuronales (Dcx+), astrocíticos (Gfap+) y oligodendrocíticos (Olig2+), que indica que las alteraciones en las decisiones de linaje de células diferenciado fueron indetectables bajo condiciones basales. Sin que se limite por teoría, la falta de incremento en la colocalización de BrdU con marcadores específicos de tipo de célula puede implicar que un mayor porcentaje de células BrdU+ no se ha podido diferenciar en ratones iNSPC-Nampt-KO. Las NSPC iNSPC-Nampt-KO se pueden haber estancado durante la diferenciación después de perder la expresión de Nestina.

Los inventores plantearon la hipótesis de que la administración sistémica de NMN puede ser capaz de corregir defectos asociados con la edad en la funcionalidad de NSPC. La inyección intraperitoneal de NMN (500 mg/kg de peso corporal) incrementó los niveles de NAD+ de hipocampo de 34 a 39 % en 15 minutos, que sugiere que NMN puede cruzar la barrera hematoencefálica (figura 23G). Para ver si la complementación con NMN puede mantener la proliferación de NSPC y la auto-renovación con la edad, los inventores trataron ratones de 6 meses de edad con NMN a la dosis diaria de 100 o 300 mg/kg de peso corporal en su agua potable hasta 18 meses de edad. El número de células Nestina+ a lo largo de la SGZ fue significativamente menor en los ratones de control de 18 meses de edad en relación con los ratones de 6 meses de edad, como se reportó previamente (Encinas et al, 2011) (figura 16J). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001. Los ratones tratados con 300 mg/kg de peso corporal de NMN mostraron un mantenimiento mejorado de la población tipo 1 (nestina radial +) con la edad. Sin embargo, la población de células proliferantes (Ki67+) permaneció similar a los controles (figura 23H). La población de neuronas recién nacidas (Dcx+) tendió a incrementar (figura 23I). Cuantificación de células Ki67+ (H) y Dcx+ (I) en el DG por unidad de área del DG (n = 5). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001. Sin que se limite por teoría, es posible que la administración de NMN mantenga la mezcla de NSPC evitando el incremento asociado con la edad en las decisiones de destino terminal.

Ejemplo de referencia 11

Este ejemplo ilustra que la inhibición de Nampt en las NSPC *in vitro* perjudica la biosíntesis y proliferación de NAD⁺.

Los inventores plantearon la hipótesis de si Nampt media en la biosíntesis de NAD⁺ específica de NSPC al usar neuroesferas de hipocampo como modelo de cultivo de NSPC *in vitro*. Las neuroesferas se trataron con un inhibidor de Nampt altamente específico, FK866, a una dosis y duración (10 nM, 48 horas) que tiene poco o ningún efecto sobre la viabilidad celular (Hasmann & Schemainda, 2003). FK866 redujo los niveles de NAD⁺ en las neuroesferas a 4 % de los controles, una disminución completamente rescatada por el tratamiento con NMN concurrente (figura 17A y 24A), que sugiere que, sin que se limite por la teoría, la actividad de Nampt es la fuente predominante de biosíntesis de NAD⁺ en las NSPC.

Los inventores investigaron cómo la inhibición de Nampt afecta a la proliferación de neuroesferas. De acuerdo con las disminuciones en la mezcla de NSPC y en la proliferación de NSPC en ratones iNSPC-Nampt-KO, FK866 redujo el número de NSPC por 61 % después de 48 horas, pero no 24 horas, de tratamiento (figura 17B-C y figura 24B). Para distinguir si esta disminución en el número de células se debió a una inhibición de la proliferación o mejora de la muerte, los inventores analizaron los niveles de proteína de marcadores de proliferación, apoptosis y autofagia. La expresión de los marcadores de proliferación Ki67 y PCNA disminuyó 87 % y 43 % respectivamente (figura 24C-24E), en tanto que los niveles de caspasa activada 3 solo incrementaron ligeramente y los niveles del marcador de autofagia, LC3B glicosilado, no cambiaron. De acuerdo con estas observaciones, el análisis paramétrico del enriquecimiento de conjunto de genes (PAGE) de un microarreglo realizado en neuroesferas tratadas con FK866 mostró que de las 50 rutas principales disminuidas de forma regulada, 13 de ellas estaban relacionadas con el ciclo celular, en tanto que ninguna de las 50 rutas principales disminuidas de forma regulada estaba implicada en la muerte celular (tabla 1, figuras 24F-G). El análisis paramétrico del enriquecimiento génico (PAGE) se llevó a cabo con base en análisis de microarreglo. Ver sección de métodos. El análisis de cambios genéticos específicos por qRT-PCR reveló que las ciclinas E y A, las dos ciclinas requeridas para la progresión celular de G1 a S, así como su regulador transcripcional corriente arriba E2F1 (Wong et al, 2011), fueron los factores primarios del ciclo celular afectados por este tratamiento (figura 17E). Estas alteraciones en la expresión génica indicaron que la reducción de la actividad de Nampt estanca las NSPC en G0/G1. Apoyando esta noción, el análisis FACS de las neuroesferas demostró que el tratamiento con FK866 incrementó la proporción de las NSPC en G0/G1 y disminuyó la proporción en la fase S (figura 17F). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001.

Tabla 1

Rango	Ciclo de células	Total	Implicado	Relación Z	Valor p
3	DNA REPLICATION	102	85	-6,20	0,000
4	DNA DEPENDENT DNA REPLICATION	56	46	-6,07	0,000
14	CELL CYCLE PROCESS	193	167	-4,75	0,000
15	NUCLEAR LUMEN	387	310	-4,74	0,000
16	CELL CYCLE GO 0007049	315	268	-4,63	0,000
19	CELL CYCLE PHASE	170	147	-4,23	0,000
25	CELL CYCLE CHECKPOINT GO 0000075	48	38	-3,92	0,000
28	M PHASE	114	100	-3,67	0,000
31	REPLICATION FORK	18	16	-3,60	0,000
32	CONDENSED CHROMOSOME	34	27	-3,57	0,000
35	MITOTIC CELL CYCLE	153	133	-3,48	0,001
45	INTERFASE	68	57	-3,28	0,001
50	INTERPHASE OF MITOTIC CELL CYCLE	62	52	-3,07	0,002

Ejemplo de referencia 12

Este ejemplo ilustra que la ablación genética de *Nampt* en las NSPC *in vitro* perjudica la biosíntesis, proliferación y diferenciación de NAD⁺.

Para valorar el efecto de la ablación crónica de Nampt sobre la funcionalidad de NSPC, los inventores extirparon genéticamente *Nampt* al infectar neuroesferas de ratones *Nampt^{fllox/flox}* con adenovirus que expresan Cre recombinasa o LacZ (control). Las neuroesferas infectadas con Cre recombinasa (Nampt Ad-Cre) en el pasaje 1 mostraron una reducción de 94 % en la expresión de ARNm de Nampt 3 días después de la delección, y las disminuciones correspondientes en la expresión de proteína Nampt y los niveles de NAD⁺ aparecieron 6 días después de la delección (figuras 25A-25E). Los análisis se llevaron a cabo después del pasaje 2, a 6 o más días después de la infección. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001. Ocho días después de la delección, las NSPC exhibieron una reducción de 73 % en los niveles de NAD⁺ que se rescató por la administración concurrente de NMN, y sin que se limite por teoría, respaldando además la noción de que la actividad de Nampt es la fuente predominante de los niveles de NSPC NAD⁺ (figura 18A). Las neuroesferas se aislaron de ratones *Nampt^{fllox/flox}* y se infectaron con un adenovirus que expresa Cre-recombinasa (Nampt AD-Cre) o un adenovirus de control que expresa LacZ (Nampt AD-LacZ).

Al igual que los cultivos tratados con FK866, las NSPC infectadas con Nampt Ad-Cre proliferantes mostraron un número de células reducido (figura 18B). Las NSPC Nampt Ad-Cre no fueron capaces de incrementar su número de células entre 24 y 144 horas de cultivo. En contraste, las células infectadas con Nampt AD-LacZ fueron capaces de incrementar exponencialmente su número de células más de 13 veces en este marco de tiempo. De acuerdo con este descubrimiento, las NSPC infectadas con Nampt Ad-Cre también mostraron una reducción de 49 % en diámetro con respecto a las NSPC infectadas con Nampt AD-LacZ, indicativa de proliferación reducida (figuras 18C-D). Puesto que las decisiones de auto-renovación de NSPC también pueden contribuir al número de células, los inventores valoraron la formación de neuroesferas secundarias, un ensayo que cuantifica la capacidad de las células habitantes de neuroesferas para reformular las neuroesferas tras la disociación. Las células infectadas con Nampt Ad-Cre generaron 63 % menos de neuroesferas secundarias que las células infectadas con Nampt AD-LacZ (figura 18E). Las NSPC de Nampt AD-LacZ y Nampt Ad-Cre no mostraron diferencia en los porcentajes de células positivas para caspasa 3 activada o TUNEL, así como ninguna diferencia en la inmunorreactividad de caspasa 3 activada como se detecta por inmunotransferencia, sin que se limite por teoría, que indica que los fenotipos observados tras la pérdida de Nampt no se deben principalmente a muerte celular (figura 25E-F). Como control positivo para la inmunorreactividad de caspasa 3 activada, las muestras indicadas se trataron con estauroporina (1 mM) (n = 6). Para ver si las neuroesferas infectadas con Nampt Ad-Cre se pueden reactivar para proliferar, los inventores colocaron en placas números iguales de células Nampt AD-LacZ y Nampt Ad-Cre después del segundo pasaje y las cultivaron en la presencia o la ausencia de NMN. El tratamiento con NMN fue capaz de reactivar completamente el potencial proliferativo de las células Nampt Ad-Cre (figura 18F-G). Colectivamente, sin que se limite por teoría, estos resultados sugieren que la biosíntesis de NAD⁺ mediada por Nampt desempeña un papel para que las NSPC progresen de manera exitosa a través del ciclo celular.

En tanto que los inventores no observaron una diferencia en las decisiones de destino de NSPC en el entorno neurogénico de la SGZ *in vivo*, los inventores detectaron una disminución en las decisiones de auto-renovación. Para ver si esto se presentaría en ausencia de las influencias del nicho SGZ, los inventores diferenciaron neuroesferas disociadas y valoraron la proporción de tipos de células resultantes por inmunofluorescencia después de 6 a 7 días de diferenciación inducida por la remoción de factores de crecimiento (figura 18H, figura 25G). Las NSPC Nampt Ad-Cre diferenciadas exhibieron una reducción de 90 % en oligodendrocitos (figura 18I). En contraste, las NSPC infectadas con Nampt Ad-Cre no mostraron ningún cambio en la generación de células Gfap + (figura 18J). El silenciamiento génico genético de Nampt también disminuyó significativamente pero más levemente la generación de neuronas (por 43 % de β -III-tubulina+, figura 18K). Por lo tanto, la disminución en los oligodendrocitos no se debió a un incremento en el destino neuronal. Como Gfap puede reconocer tanto NSPC como astrocitos maduros, los inventores emplearon Nestina y S100 β para distinguir si la disminución en los oligodendrocitos que observamos tras la inactivación de Nampt se debió a una elección de destino celular en estas direcciones. En tanto que no hubo cambio detectable en la generación de astrocitos maduros S100 β + en cultivos de Nampt Ad-Cre, hubo un incremento de 4 veces en el porcentaje de células Nestina+ (6 % en células Nampt Ad-LacZ; 23 % en células Nampt Ad-Cre), sin que se limite por teoría, sugiriendo quiescencia en lugar de diferenciación astrocítica precoz (figura 18L). Todos estos efectos se rescataron por tratamiento con NMN. Los inventores también observaron un incremento leve en la muerte de células TUNEL+ bajo estas condiciones (incremento de 33 % con respecto a las células Nampt Ad-LacZ). *, ^ y # indican significancia estadística entre Nampt AD-LacZ y Nampt AD-Cre, Nampt AD-LacZ y Nampt AD-LacZ+NMN, y Nampt AD-Cre y Nampt AD-Cre+NMN, respectivamente. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001. (figuras 18A-L) Conjuntamente, sin que se limite por teoría, estos datos sugieren que el silenciamiento génico genético de Nampt evita la diferenciación exitosa de oligodendrocitos de las NSPC, potencialmente debido a quiescencia como se indica por una retención de características de NSPC.

Ejemplo de referencia 13

Este ejemplo ilustra que el silenciamiento génico genético de Nampt perjudica la formación de OPC *in vitro*.

Puesto que la diferenciación usando un protocolo de diferenciación de linaje no específico (por remoción de factores de crecimiento) reveló un requerimiento específico para Nampt en la generación exitosa de oligodendrocitos inmaduros O4+, los inventores preguntaron a continuación qué etapa o etapas de diferenciación de NSPC en oligodendrocitos depende de Nampt al emplear un protocolo de diferenciación que promueve el linaje de oligodendrocitos (figura 19A, figura 26A). Las neuroesferas se aislaron de ratones Nampt^{flx/flx} y se infectaron con un adenovirus que expresa Cre-recombinasa (Nampt AD-Cre) o un adenovirus de control que expresa LacZ (Nampt AD-LacZ). Como se observó previamente usando un protocolo de diferenciación de linaje no específico, la proporción de oligodendrocitos intermedios O4+ disminuyó drásticamente en cultivos de Nampt Ad-Cre a los 6-7 días después de la diferenciación (figura 19B). Los inventores observaron que la ablación de Nampt dio por resultado una mezcla disminuida de OPC (Pdgfra+), pero una mezcla incrementada de NSPC Nestina+. La proporción de astrocitos Gfap+/NSPC también incrementó ligeramente. Para investigar si el agotamiento de la población de OPC fue preexistente o inducido tras la diferenciación, los inventores valoraron la población de OPC presente durante la proliferación. Las neuroesferas disociadas se cultivaron en medios de proliferación que contiene PDGF α . (figura 26B) y después de 2 días de diferenciación (figura 19C), un punto de tiempo que enriquece las OPC como se valora por inmunofluorescencia. Ambos puntos de tiempo también mostraron pérdida de OPC (Pdgfra+, Olig2+). Estos resultados apoyan que, sin que se limite por teoría, Nampt desempeña un papel para que las NSPC se diferencien en OPC.

Los inventores observaron que Sirt2 se aumentó de forma regulada durante la diferenciación de oligodendrocitos *in vitro* y se expresó en la SGZ en células Nampt+ y NSPC NestinaGFP+ (figura 26C). Los inventores trataron de forma aguda

NSPC con el inhibidor selectivo de Sirt2, AGK2 o el inhibidor de Sirt1, EX527. En tanto que ambos inhibidores suprimieron de forma aguda la formación de oligodendrocitos (O4+, figura 19D), ni la ablación crónica de Sirt2 en las NSPC aisladas de ratones *Sirt2^{-/-}* ni el silenciamiento génico mediado por adenovirus Cre de Sirt1 en las neuroesferas derivadas de *Sirt1^{fllox/fllox}* afectaron la oligodendrogénesis (*Pdgfra*+, *Olig2*+, *O4*+), excepto que la deficiencia de Sirt1 afectó la producción de oligodendrocitos intermedios *O4*+ (figura 19E). Los inventores generaron neuroesferas inactivadas *Sirt1/Sirt2*-doble (*Sirt1/2* DKO). De acuerdo con los estudios de inhibidores (figura 19D), las neuroesferas *Sirt1/2* DKO disociadas fueron incapaces de formar células de linaje de oligodendrocitos tras la diferenciación (figura 19E). Para valorar el papel de Sirt1 y Sirt2 corriente abajo de la actividad de Nampt, los inventores examinaron la expresión de genes asociados con la formación de OPC en neuroesferas de Nampt Ad-Cre, neuroesferas de *Sirt1/2* DKO y sus respectivos controles. Las neuroesferas Nampt Ad-Cre y *Sirt1/2* DKO disociadas mostraron disminuciones similares en la expresión de ARNm de *Pdgfra*, *Sox10*, *Nkx2.2* después de 2 días de diferenciación (figura 19F-G). Las neuroesferas Nampt Ad-Cre y *Sirt1/2* DKO disociadas exhibieron respectivamente incrementos similares en la expresión de *p21* (*cdkn1a*). La expresión de *Olig1* no mostró ningún cambio o ligera reducción por estas ablaciones genéticas, potencialmente debido a su menor expresión en las NSPC con respecto a *Olig2* (Ligon et al, 2007) y papeles predominantes en la maduración y remielinización de oligodendrocitos en lugar de la especificación. Ni el silenciamiento génico mediado por Cre de Sirt1 en neuroesferas ni las neuroesferas cultivadas de ratones *Sirt1^{-/-}* o *Sirt2^{-/-}* de cuerpo completo exhibieron defectos en la proliferación (figura 26G-J). Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,001. Los inventores concluyen que Sirt1 y Sirt2 pueden mediar de manera redundante la diferenciación de NSPC en OPC.

Ejemplo de referencia 14

Este ejemplo ilustra que la delección específica de NSPC adultas de Nampt altera la diferenciación de NSPC en respuesta a insulto *in vivo*.

Los inventores observaron la ablación de Nampt en la diferenciación de NSPC en OPC *in vitro*, pero no la oligodendrogénesis en la SGZ de ratones iNSPC-Nampt-KO *in vivo* (figura 16I). Los inventores valoraron el porcentaje de células NestinaGFP+ que expresaron *Olig2* en las SVZ de ratones iNSPC-GFP e iNSPC-Nampt-KO (figura 20A). Los ratones iNSPC-Nampt-KO mostraron un menor porcentaje de oligodendrocitos generados a partir de NSPC adultas.

Los inventores emplearon el modelo de cuprizona de desmielinización y remielinización. Específicamente, los inventores alimentaron a ratones iNSPC-Nampt-KO y de control de compañero de camada (iNSPC-GFP) de 6 a 9 semanas de edad con una dieta que contiene cuprizona al 0,2 % durante 4-5 semanas, induciendo la delección de Nampt en la población Nestina+ adulta la semana antes de comenzar la dieta de cuprizona (figura 20B) (Skripuletz et al, 2011). Para asegurar que el análisis de la progenie de células Nestina+ adultas, todos los ratones de la cohorte expresaron Cre recombinasa bajo el promotor de Nestina inducible (Nestina-CreERT2) (Lagace et al, 2007) y el transgén indicador GFP sensible a Cre recombinasa mencionado anteriormente. El enfoque del análisis fue en células marcadas con trazador de linaje (NestinaGFP+).

La alimentación con cuprizona no alteró el número total de células NestinaGFP+ presentes en el DG de iNSPC-GFP (figura 27AC), lo que sugiere, sin que se limite por la teoría, que la proliferación de NSPC no se alteró. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. *, ^P < 0,05. **, ^^P < 0,01. ***, ^^P < 0,001. Los ratones alimentados con cuprizona exhibieron un porcentaje incrementado de células NestinaGFP+ que se colocalizaron con los marcadores de NSPC Nestina+ (de 13 a 35 %) y Gfap+ (de 19 a 41 %), sugiriendo que, sin que se limite por teoría, el tratamiento con cuprizona impidió que las NSPC de SGZ se diferenciaron terminalmente y en su lugar dio por resultado su retención de características de NSPC, que se puede presentar a través de decisiones de auto-renovación y/o quiescencia incrementada (figura 27D-E). Después, los inventores valoraron la colocalización entre NestinaGFP y marcadores específicos de oligodendrocitos, *Sox10* y *APC*. Sin embargo, la SGZ no produjo sustancialmente oligodendrocitos incluso en respuesta a desmielinización (figura 27F-G). Por lo tanto, sin que se limite por teoría, las NSPC de SGZ no parecen ser los principales mediadores de remielinización a corto plazo en el hipocampo.

Los inventores valoraron las decisiones de destino de las células migratorias derivadas de la población Nestina+ adulta en la zona subcallosa del cuerpo calloso (figura 27A). En el CC de iNSPC-GFP, prácticamente no se observaron células NestinaGFP+ o Nestina+ en ratones alimentados con alimento normal (figura 20C-D, figura 27A). No hubo diferencias en el número de células NestinaGFP+ en el CC entre ratones de control e iNSPC-Nampt-KO, sugiriendo, sin que se limite por teoría, que la pérdida de Nampt ni afectó a la proliferación o migración de NSPC inducida por insulto. En el CC de iNSPC-GFP, la alimentación con cuprizona incrementó significativamente el porcentaje de células NestinaGFP+Nestina+ (de 3 a 41 %) pero disminuyó las células positivas dobles NestinaGFP+Gfap+ (de 60 a 24 %), sugiriendo, sin que se limite por teoría, decisiones de destino de auto-renovación incrementadas a expensas de decisiones de destino astrocítico (figura 20E-G). En ratones de control, la alimentación con cuprizona también incrementó el número de células positivas dobles NestinaGFP+*Sox10*+ (de 2 a 16 %) y NestinaGFP+*Apc*+ (de 0 a 4 %), que sugiere decisiones de destino de linaje de oligodendrocitos incrementadas (figura 20H-I).

En contraste, las células NestinaGFP+ en el CC de iNSPC-Nampt-KO mostraron significativamente menos colocalización con Nestina, *Sox10* y *Apc* y más colocalización con Gfap (figura 20F-I). Curiosamente, Nampt solo se expresó en el CC después de un insulto (figura 20J, figura 27H). Además, Nampt colocalizó con marcadores de las NSPC (*Sox2*, figura 27H) y oligodendrocitos (*Olig2*, figura 20J). Estos resultados sugieren, sin que se limite por teoría, que Nampt se expresa

específicamente en NSPC remielinizantes derivadas de SGZ/SVZ y desempeña un papel en la oligodendrogénesis en respuesta al insulto.

Ejemplo de referencia 15

Este ejemplo ilustra un modelo para el papel de la biosíntesis de NAD mediada por Nampt en las NSPC sin estar limitado por teoría.

La biosíntesis de NAD⁺ mediada por Nampt promueve la autorrenovación, proliferación y diferenciación de NSPC en oligodendrocitos. En tanto que el mecanismo por el cual Nampt promueve la auto-renovación y proliferación sigue sin identificarse, la biosíntesis de NAD⁺ mediada por Nampt activa Sirt1 y Sirt2 para promover las decisiones de destino de linaje de oligodendrocitos NSPC por un mecanismo que implica la disminución de forma regulada transcripcional de *Pdgfra*, *Sox10* y *Nkx2.2* y el aumento de forma regulada transcripcional de *p21* (*cdkn1a*). Sirt1 y Sirt2 pueden actuar mediante un efecto sobre la actividad de Olig2. (figura 21)

Los inventores mostraron que la mezcla de NSPC disminuyó con la edad y que la administración de NMN a largo plazo fue capaz de mantener la mezcla de NSPC. Los inventores afirman que se puede usar una dosis más alta de NMN para promover la proliferación de NSPC. La inyección intraperitoneal de NMN incrementa sustancialmente los niveles de NAD⁺ de hipocampo en 15 minutos (figura 23G), sin que se limite por teoría, sugiere que NMN puede cruzar la barrera hematoencefálica.

Como los ratones deficientes en E2F1 han reducido significativamente la muerte de NSPC de hipocampo (Cooper-Kuhn et al, 2002), sin que se limite por teoría, la disminución observada en E2F1 tras la inhibición de Nampt puede explicar este fenómeno (figura 17E). Los inventores también observaron que la pérdida de actividad de Nampt disminuyó de forma regulada específicamente la expresión de ciclina E y A. Ciclinas tipo E regulan la progresión de G1. Los inventores observaron la disminución de forma regulada de la expresión de E2F1, que regula transcripcionalmente ciclina E, por lo tanto, sin que se limite por teoría, es probable que la disminución de forma regulada de E2F1 contribuya a la disminución de forma regulada de ciclina E. Los inventores también observaron aumento de forma regulada de *p21* tras pérdida de Nampt. Por lo tanto, el aumento de forma regulada de *p21* que se ve tras la pérdida de Nampt, sin que se limite por teoría, también puede contribuir a la disminución de forma regulada de la actividad de E2F/ciclina E. Conforme se induce la expresión de ciclina A después de E2F y ciclina E (Wong et al, 2011), los cambios en los niveles de ciclina A son probablemente posteriores a ambos cambios mencionados anteriormente. En tanto que se ha enlazado Nampt a la ruta E2F/ciclina E, el o los mediadores de conexión siguen sin estar claros. Los inventores no encontraron que Sirt1 ni Sirt2 estuvieran en corriente abajo del efecto de la biosíntesis de NAD⁺ mediada por Nampt en la proliferación. En tanto que es posible que Sirt1/2 funcione redundantemente para mediar la proliferación de NSPC, la expresión relativamente baja de Sirt2 en NSPC (figura 26G) hace que esta posibilidad sea improbable, sin que se limite por teoría.

Los presentes inventores revelaron que la ablación de Nampt redujo específicamente la proporción de OPC *Pdgfra*⁺ generadas por NSPC, así como la transcripción de *Pdgfra*, *Sox 10* y *Nkx2.2*, pero aumentó de forma regulada la expresión de *p21*. Los resultados mostraron que en las neuroesferas, el tratamiento con NMN rescató los defectos en la oligodendrogénesis provocados por una reducción en los niveles de NAD⁺. Por otra parte, la administración de NMN sistémica fue capaz de aumentar sustancialmente los niveles de NAD⁺ en el hipocampo y de incrementar la mezcla de NSPC. Por lo tanto, la administración de NMN puede ser una intervención eficiente para mejorar la mezcla de NSPC y promover la remielinización al activar NSPC endógenas durante el proceso de envejecimiento y/o en enfermedades neurodegenerativas que provocan desmielinización. Los resultados proporcionan evidencia del potencial terapéutico de la auto-renovación, proliferación y diferenciación de NSPC mediadas por Nampt en oligodendrocitos.

Ejemplo de referencia 16

Este ejemplo ilustra un incremento en la densidad ósea en individuos de edad avanzada por la administración de NMN.

Los inventores midieron la densidad mineral ósea (BMD) de ratones de control y tratados con NMN en el punto de tiempo de 12 meses de un experimento de administración de NMN de 12 meses de duración (figura 28A-B) por absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) (figura 2 de la divulgación 7). En este punto de tiempo, los ratones tuvieron 17-18 meses de edad. Los inventores encontraron que los ratones tratados con NMN mostraron incrementos en la BMD de una manera dependiente de la dosis, y la diferencia entre los grupos de control y de 300 mg/kg es estadísticamente significativa ($P = 0,037$, ANOVA, prueba post hoc de Tukey DHS). Los ratones de los grupos de 100 y 300 mg/kg mostraron incrementos de 2,8 % y 5,9 % en la BMD, respectivamente. (figura 29) Aunque la pérdida de BMD asociada con la edad varía ampliamente entre cepas de ratón (<http://phenome.jax.org>), el grado de estos incrementos de BMD observados es significativo, que indica que NMN es capaz de mejorar la BMD en individuos de edad avanzada. Estos datos indican que la administración de NMN se puede usar para tratar osteoporosis asociada con la edad en humanos.

Ejemplo de referencia 17

Este ejemplo ilustra la caracterización de la pérdida de biosíntesis de NAD mediada por NAMPT en la supervivencia de neuronas PR.

Los inventores examinaron el efecto de interrumpir selectivamente la biosíntesis de NAD dentro de PR. Los inventores utilizaron la estrategia de cre-lox para generar ratones que tuvieron NAMPT eliminada condicionalmente de cualquiera de los bastones (NAMPT bastón-CKO) o conos (NAMPT cono-CKO). Los ratones NAMPT fl/fl, así como los ratones rodopsina-cre y cono opsina-cre se han caracterizado previamente. Ambos ratones cko de bastón y cono se generan con frecuencias mendelianas normales y nacen normales sin anomalías sistémicas observables (datos no mostrados). Todos los análisis estructurales y funcionales realizados en ratones CKO se analizan en comparación con controles de compañeros de camada. Los bastones constituyen la mayoría de las neuronas PR (97 % de todos los fotorreceptores). Las retinas de ratones NAMPT bastón-CKO mostraron una reducción significativa de NAMPT dentro de bastones por PCR, inmunohistoquímica e inmunotransferencia (figura 30A-B). La examinación biomicroscópica de ratones NAMPT bastón-cko demostró un fenotipo degenerativo caracterizado por atrofia masiva de la retina neurosensorial, atenuación vascular con moteado de pigmento y atrofia del epitelio de pigmento de retina subyacente. La degeneración de retina neurosensorial se asoció con atrofia secundaria y palidez del nervio óptico (figura 30C).

Ejemplo de referencia 18

Este ejemplo ilustra electrorretinografía (ERG) realizada para medir la función de neurona PR y de retina.

Los ratones NAMPT bastón-CKO demostraron una reducción dramática en las respuestas escotópicas (asociadas a bastón) y fotópicas (asociadas a cono) en comparación con los animales de control de compañeros de camada (figura 30D-H). Las mediciones de agudeza visual fotópica confirmaron la pérdida de visión en ratones bastón-CKO (figura 30G). La examinación histopatológica de ojos de ratones NAMPT bastón-CKO se caracterizó por degeneración retiniana con pérdida progresiva de la capa nuclear exterior con el paso del tiempo con reducción significativa del espesor de retina y posterior extensión de la neurodegeneración a múltiples capas de retina (figura 30H). Las mediciones de NAD normalizadas obtenidas de las retinas enteras NAMPT bastón-cko mostraron una reducción significativa en NAD que es especialmente importante dado que la función NAMPT se elimina selectivamente solo de las neuronas PR bastón con otras células de retina normales (figura 30I). Estos resultados sugieren que, sin que se limite a teoría, si la actividad enzimática de NAMPT en la biosíntesis de NAD en neuronas PR de bastón es necesaria para la supervivencia celular, la conversión intracelular de NAM en NMN por NAMPT puede desempeñar un papel.

Los presentes inventores determinaron que la complementación exógena con NMN es capaz de rescatar neuronas PR de la muerte celular en ratones CKO. La administración intraperitoneal (i.p.) se eligió para obtener niveles tempranos y sostenidos de NMN. En estos experimentos, los ratones NAMPT bastón-CKO recibieron NMN (150 mg/kg) o PBS i.p. diariamente a partir del día P5. ERG a las 4 semanas en ratones CKO tratados con NMN mostró un rescate significativo de la función fotópica y escotópica en comparación con el tratamiento con PBS (figura 30J-L). No hubo efecto de NMN sobre los animales de control de compañeros de camada.

Ejemplo de referencia 19

Este ejemplo ilustra el rescate de NMN en ratones NAMPT cono-CKO.

En estos experimentos, los ratones NAMPT cono-CKO (sin tratamiento con NMN) demostraron cambios similares pero más leves en la biomicroscopía consistentes con la degeneración neurorretiniana como se ve en los ratones bastón-CKO (figura 31A). ERG demostró disminución significativa y progresiva en la función de cono como se evidencia por respuestas fotópicas reducidas con el paso del tiempo con reducción secundaria en las respuestas escotópicas (figura 31B-D). Estos cambios estructurales y funcionales cuantificables se asociaron con una disminución de la agudeza visual en ratones cono-CKO (figura 31E). Los análisis histopatológicos confirmaron la degeneración de capa nuclear exterior con la posterior degeneración de retina de múltiples capas y la muerte celular en ratones cono-CKO similar a los cambios vistos anteriormente para los ratones con bastón-CKO. Al igual que con ratones NAMPT bastón-CKO, la administración de NMN i.p. a ratones NAMPT cono-CKO también fue capaz de mejorar la función de ERG en comparación con ratones cono-CKO tratados con PBS (figura 31 F-H). El tratamiento con NMN no tuvo efecto en los controles de compañeros de camada (figura 34). Estos datos sugieren que, sin que se limite por la teoría, la biosíntesis de NAD mediada por NAMPT es necesaria para la supervivencia y función de las neuronas PR tanto de bastón como de cono. Además, proporcionar tratamiento con NMN es capaz de rescatar neuronas PR y visión.

Los inventores usaron una línea de células PR cónicas 661W y trataron las células con el inhibidor farmacológico específico de NAMPT FK866 (200 nM). El tratamiento con FK866 de células cónicas *in vitro* provoca disminución en los niveles de NAD intracelular y muerte celular significativa después de las 4 horas de tratamiento (figuras 31, 31J). La muerte celular progresa dramáticamente durante las próximas 20 horas. NMN (100 μ M) fue capaz de rescatar completamente las células de la muerte asociada con el tratamiento con FK866 y restaurar NAD a los niveles normales (figuras 31I, 31K). Estos resultados *in vitro* confirman que la administración de NMN puede promover la supervivencia de neurona PR.

Ejemplo de referencia 20

Este ejemplo ilustra que la supervivencia de PR regulada por NAD es independiente de las sirtuinas individuales.

Los inventores examinaron el efecto de la delección de varias sirtuinas en la supervivencia de PR. Los ratones Sirt 1 PR CKO y los ratones Sirt 2-5 $-/-$ tuvieron función y estructura de neurona PR y de retina normales cuando se examinaron por biomicroscopía de fondo y ERG (figura 3A-J y figura S2). Los ratones Sirt6 $-/-$ tienen un fenotipo neurodegenerativo profundo y mueren alrededor de 3-4 semanas de edad. Como tal, se examinaron ratones inactivados condicionales de bastón y cono sirt6 que también tuvieron estructura y función de retina normal (figura 32, 32L y figura 35). Sin que se limite por teoría, estos descubrimientos demuestran que las sirtuinas individuales no son causantes de degeneración de PR mediada por NAMPT.

Ejemplo de referencia 21

Este ejemplo ilustra que la pérdida de fotorreceptores y la ceguera se asocia con la disfunción mitocondrial.

La examinación microscópica electrónica demostró cambios dismórficos en los segmentos interiores de la retina junto con la alteración de los segmentos exteriores en ratones CKO de bastones, pero mostró una organización celular normal y estructuras subcelulares en controles de compañeros de camada a las 4 semanas de edad (figura 33A, 33B). A las 4 semanas de edad, los números mitocondriales en las retinas CKO se redujeron significativamente, las mitocondrias se redondearon y se estrecharon con pérdida de crestas en oposición a las mitocondrias normalmente alargadas con crestas sanas observadas en ratones de control de camada emparejados en edad (figura 33A, 33B). Hubo una abundancia de vacuolas degenerativas con orgánulos ingeridos que incluyen mitocondrias en ratones bastón-CKO sin estas estructuras identificadas en los controles tipo silvestre de compañeros de camada. A las 3 semanas de edad, se pudieron identificar cambios sutiles en los segmentos interiores en ratones bastón-CKO, aunque no fueron tan dramáticos como los observados a las 4 semanas (figura 36). Estos resultados sugieren que, sin que se limite por teoría, la deficiencia de NAD puede deteriorar la función y estructura mitocondrial. Los inventores trataron células cónicas 661W con inhibidor de NAMPT FK866 (200 nM). En el ensayo de medición de velocidad de consumo de oxígeno, se analizaron múltiples aspectos de la función mitocondrial. Como se muestra en la figura 33C, la respiración máxima se redujo significativamente en células cónicas 661 W después de la inhibición de la función de NAMPT (figura 33C). El tratamiento con NMN fue capaz de revertir completamente los efectos de FK866 en la función mitocondrial de fotorreceptores de células cónicas, confirmando el papel de NAD en los efectos mediados por NAMPT en las neuronas PR (figura 33C).

Se realizó un análisis metabolómico no desviado usando espectrofotometría de masas (GC-MS y LC-MS) en retinas aisladas de ratones NAMPT bastón-CKO y se compararon con retinas de control de compañeros de camada. Se identificaron diferencias significativas en los metabolitos mitocondriales implicados en el ciclo de TCA.

Referencias

- Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ, Stiles CD (2004) bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science* (New York, NY 306: 2111-2115
- Artegiani, B., et al. (2012) Age-related cognitive decline: can neural stem cells help us? *Aging* 4: 176-186
- Ben Abdallah, N.M., et al. (2010) Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiology of aging* 31: 151-161
- Bieganski, P., et al. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. (2004) *Cell* 117, 495-502.
- Bouab, M., et al. (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173: 135-149
- Canto, C., et al. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. (2012) *Cell-Metab.* 15, 838-847
- Carlson, L.A. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. (2005) *J. Intern. Med.* 258, 94-114.
- Cheadle, C., et al. (2003) Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn* 5: 73-81
- Chen, J., et al. (2013) SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β /beta-catenin signaling. *Hepatology* (Baltimore, Md 57: 2287-2298
- Colak, D., et al. (2008) Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* 28: 434-446
- Collins, P.B., et al. Comparative metabolism of nicotinamide and nicotinic acid in mice. (1971) *Biochem. J.* 125, 117P
- Collins, P.B., et al. The management of nicotinamide and nicotinic acid in the mouse. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 778-783
- Cooper-Kuhn, C.M., et al. (2002) Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1. *Molecular and cellular neurosciences* 21: 312-323
- Dasgupta, B., et al. (2005) Neurofibromin regulates neural stem cell proliferation, survival, and astroglial differentiation in vitro and in vivo. *J Neurosci* 25: 5584-5594
- Decker, L., et al. (2002) Growth factor treatment promotes mobilization of young but not aged adult subventricular zone precursors in response to demyelination. *Journal of neuroscience research* 69: 763-771
- Deng, W., et al. (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews* 11: 339-350
- Dienel, G.A., et al. (2006) Astrocyte activation in working brain: energy supplied by minor substrates. *Neurochemistry international* 48: 586-595

- Di Girolamo, M., et al. Physiological relevance of the endogenous mono(ADP-ribosyl)ation of cellular proteins. (2005) FEBS J. 272, 4565-4575.
- Doucette, J.R., et al. (2010) Age-related and cuprizone-induced changes in myelin and transcription factor gene expression and in oligodendrocyte cell densities in the rostral corpus callosum of mice. Cellular and molecular neurobiology 30: 607-629
- Encinas, J.M., et al. (2011) Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. Cell stem cell 8: 566-579
- Folmes, C.D., et al. (2012) Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. Cell stem cell 11: 596-606
- Franklin, R.J., et al. (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy. Nature reviews 9: 839-855
- Friebe, D., et al. (2011) Impact of metabolic regulators on the expression of the obesity associated genes FTO and NAMPT in human preadipocytes and adipocytes. PloS one 6: e19526
- Fu, J., et al. (2006) High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. Diabetologia 49: 1027-1038
- Gao, Q., et al. (2007) Hyperglycemic condition disturbs the proliferation and cell death of neural progenitors in mouse embryonic spinal cord. Int J Dev Neurosci 25: 349-357
- Garten, A., et al. Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. (2009) Trends Endocrinol. Metab. 20, 130-138.
- Gudi, V., et al. (2009) Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. Brain research 1283: 127-138
- Guillemin, G.J., et al. (2007) Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. J Neurosci 27: 12884-12892
- Hack, M.A., et al. (2005) Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. Nature neuroscience 8: 865-872
- Hack, M.A., et al. (2004) Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. Molecular and cellular neurosciences 25: 664-678
- Hara, N., et al. Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. (2007) J Biol Chem 282, 24574-82.
- Hasmann, M., et al. (2003) FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. Cancer research 63: 7436-7442
- Hisahara, S., et al. (2008) Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 15599-15604
- Houtkooper, R.H., et al. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. (2010) Endocr. Rev. 31, 194-223.
- Husain, J., et al. (1995) Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species. Brain research 698: 86-94
- Imai, S. Dissecting systemic control of metabolism and aging in the NAD World: the importance of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis. (2011) FEBS Lett. 585, 1657-1662.
- Imai, S. et al. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. (2010) Trends Pharmacol. Sci. 31, 212-220.
- Imai, S. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases. (2009) Curr. Pharm. Des. 15, 20-28.
- Imai, S. A possibility of nutraceuticals as an anti-aging intervention: Activation of sirtuins by promoting mammalian NAD biosynthesis. (2010) Pharmacol. Res. 62, 42-47.
- Ito, K., et al. (2012) A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. Nature medicine 18: 1350-1358
- Jablonska, B., et al. (2010) Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. Nature neuroscience 13: 541-550
- Jackson, E.L., et al. (2006) PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form gliomalike growths in response to increased PDGF signaling. Neuron 51: 187-199
- Jadasz, J.J., et al. (2012) The remyelination Philosopher's Stone: stem and progenitor cell therapies for multiple sclerosis. Cell and tissue research 349: 331-347
- Ji, S., et al. (2011) Sirt2 is a novel in vivo downstream target of Nkx2.2 and enhances oligodendroglial cell differentiation. Journal of molecular cell biology 3: 351-359
- Jin, K., et al. (2003) Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. Aging cell 2: 175-183
- Jin, Y.H., et al. (2008) Sirt2 interacts with 14-3-3 beta/gamma and down-regulates the activity of p53. Biochemical and biophysical research communications 368: 690-695
- Kim, H.S., et al. (2011) SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. Cancer cell 20: 487-499
- Knobloch, M., et al. (2013) Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. Nature 493: 226-230
- Lagace, DC, et al. (2007) Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. J Neurosci 27: 12623-12629
- Lau, C., et al. Isoform-specific targeting and interaction domains in human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferases. (2010) J. Biol. Chem. 285, 18868-18876.
- Lee, H.C. Cyclic ADP-ribose and NAADP: fraternal twin messengers for calcium signaling. (2011) Sci. China Life Sci. 54, 699-711.

- Li, W., et al. (2007) Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin. *J Neurosci* 27: 2606-2616
- Ligon, K.L., et al. (2007) Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 53: 503-517
- 5 Liu, A., et al. (2006) A molecular insight of HesS-dependent inhibition of myelin gene expression: old partners and new players. *The EMBO journal* 25: 4833-4842
- Lu, P.P., et al. (2012) A critical cell-intrinsic role for serum response factor in glial specification in the CNS. *J Neurosci* 32: 8012-8023
- Lu, Q.R., et al. (2002) Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109: 75-86
- 10 Lugert, S., et al. (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell stem cell* 6: 445-456
- Luo, J., et al. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-148
- Madisen, L., et al. (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* 13: 133-140
- 15 Mehta, S., et al. (2011) The central nervous system-restricted transcription factor Olig2 opposes p53 responses to genotoxic damage in neural progenitors and malignant glioma. *Cancer cell* 19: 359-371
- Menn, B., et al. (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918
- Nait-Oumesmar, B., et al. (1999) Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *The European journal of neuroscience* 11: 4357-4366
- 20 Norkute, A., et al. (2009) Cuprizone treatment induces demyelination and astrogliosis in the mouse hippocampus. *Journal of neuroscience research* 87: 1343-1355
- Outeiro, T.F., et al. (2007) Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science (New York, NY)* 317: 516-519
- 25 Peck, B., et al. (2010) SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Molecular cancer therapeutics* 9: 844-855
- Picard-Riera, N., et al. (2002) Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13211-13216
- 30 Plassman, B.L., et al. (2008) Prevalence of cognitive impairment without dementia in the United States. *Annals of internal medicine* 148: 427-434
- Polager, S., et al. (2009) p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 9: 738-748
- Prozorovski, T., et al. (2008) Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nature cell biology* 10: 385-394
- 35 Rafalski, V.A., et al. (2013) Expansion of oligodendrocyte progenitor cells following SIRT1 inactivation in the adult brain. *Nature cell biology* 15: 614-624
- Revollo, J.R., et al. (2004) The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 279: 50754-50763
- Revollo, J.R., et al. (2007) Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell metabolism* 6: 363-375
- 40 Rongvaux, A., et al. (2008) Nicotinamide phosphoribosyl transferase/pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin is required for lymphocyte development and cellular resistance to genotoxic stress. *J Immunol* 181: 4685-4695
- Rothgiesser, K.M., et al. (2010) SIRT2 regulates NF-kappaB dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *Journal of cell science* 123: 4251-4258
- 45 Saharan, S., et al. (2013) SIRT1 regulates the neurogenic potential of neural precursors in the adult subventricular zone and hippocampus. *Journal of neuroscience research* 91: 642-659
- Saito, K., et al. (2009) Ablation of cholesterol biosynthesis in neural stem cells increases their VEGF expression and angiogenesis but causes neuron apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8350-8355
- 50 Sanchez-Abarca, L.I., et al. (2001) Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids. *Glia* 36: 321-329
- Sassone-Corsi, P. Minireview: NAD⁺, a circadian metabolite with an epigenetic twist. (2012) *Endocrinology* 153, 1-5.
- Schreiber, V., et al. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 517-528.
- 55 Sim, F.J., et al. (2002) The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *J Neurosci* 22: 2451-2459
- Skripuletz, T., et al. (2011) De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: the old, the new, and the unexpected. *Histology and histopathology* 26: 1585-1597
- Soundarapandian, M.M., et al. (2011) Zfp488 promotes oligodendrocyte differentiation of neural progenitor cells in adult mice after demyelination. *Scientific reports* 1: 2
- 60 Stein, L.R., et al. (2012) The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23: 420-428
- Steiner, B., et al. (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46: 41-52
- 65 Stoll, E.A., et al. (2011) Aging neural progenitor cells have decreased mitochondrial content and lower oxidative metabolism. *The Journal of biological chemistry* 286: 38592-38601

- Sun, Y., et al. (2011) Phosphorylation state of Olig2 regulates proliferation of neural progenitors. *Neuron* 69: 906-917
- Takebayashi, H., et al. (2002) The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* 12: 1157-1163
- 5 Tyler, W.A., et al. (2011) Proteomic identification of novel targets regulated by the mammalian target of rapamycin pathway during oligodendrocyte differentiation. *Glia* 59: 1754-1769
- Van Leeuwen, I.M., et al. (2013) Modulation of p53 C-terminal acetylation by mdm2, p14ARF, and cytoplasmic SirT2. *Molecular cancer therapeutics* 12: 471-480
- Verderio, C., et al. (2001) Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry* 78: 646-657
- 10 Voloboueva, L.A., et al. (2010) Mitochondrial protection attenuates inflammation-induced impairment of neurogenesis in vitro and in vivo. *J Neurosci* 30: 12242-12251
- von Bohlen und Halbach O (2011) Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell and tissue research* 345: 1-19
- Wang, C., et al. (2006) Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nature cell biology* 8: 1025-1031
- 15 Wang, P., et al. (2011a) Nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against ischemic stroke through SIRT1-dependent adenosine monophosphate-activated kinase pathway. *Annals of neurology* 69: 360-374
- Wang, W., et al. (2011b) Mitochondrial DNA damage level determines neural stem cell differentiation fate. *J Neurosci* 31: 9746-9751
- 20 Wegner, M., et al. (2008) A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* 35: 3-12
- Wilhelm, F., et al. (2006) The NAD⁺ /NADH redox state in astrocytes: independent control of the NAD⁺ and NADH content. (2011) *J Neurosci Res* 89, 1956-1964.
- Wong, J.V., et al. (2011) Network calisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 10: 3086-3094
- 25 Yang, H., et al. Nutrientsensitive mitochondrial NAD(+) levels dictate cell survival. (2007) *Cell* 130, 1095-1107.
- Yoshino, J., et al. (2011) Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell metabolism* 14: 528-536
- Zhang, J., et al. (2012) Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell stem cell* 11: 589-595
- 30 Zhang, W., et al. (2010) Neuronal protective role of PBEF in a mouse model of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1962-1971
- Zhang, Y., et al. (2011) Inhibition of Sirt1 promotes neural progenitors toward motoneuron differentiation from human embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 404: 610-614
- Zhou, Q., et al. (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109: 61-73
- 35 Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ea., Elsevier, 1985; *Methods in Enzymology*, K. Widder et al, Ed., Academic Press, 42, p.309-396, 25 1985; *A Textbook of Drug Design and Development*, Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, ea., Chapter 5; "Design and Applications of Prodrugs" p.113-191, 1991; *Advanced Drug Delivery Reviews*, H. Bundgaard, 8, p.1-38, 1992; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, p. 285, 30 1988; *Chem. Pharm. Bull.*, N. Nakaya et al, 32, p. 692, 1984;
- 40 Pro-drugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi and V. Stella, Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and Bioreversible Carriers in Drug Design, Edward B. Roche, ea., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

REIVINDICACIONES

1. Mononucleótido de nicotinamida (NMN) o una sal del mismo para uso al tratar o prevenir el ojo seco en un sujeto.
- 5 2. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el NMN o sal del mismo se administra a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal/día a 300 mg/kg de peso corporal/día.
3. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el NMN o sal del mismo se administra de manera oral.
- 10 4. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el NMN o sal del mismo se administra por administración tópica al ojo.
- 15 5. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el NMN o una sal del mismo se comprende en una composición farmacéuticamente aceptable.
6. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la composición farmacéuticamente aceptable comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en fosfato dicálcico, celulosa microcristalina, ácido esteárico, croscarmelosa de sodio, trisilicato de magnesio, estearato de magnesio, hidroxipropilmetilcelulosa, hipromelosa, dióxido de titanio, citrato tripotásico, alcohol polivinílico, sílice pirógena, ácido cítrico, polietilenglicol, talco y cualquier combinación de los mismos.
- 25 8. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la composición farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en una píldora, una tableta, un comprimido oblongo, una cápsula, una tableta masticable, una tableta de disolución rápida, un polvo, un gránulo, una tableta efervescente, una cápsula de gelatina dura, una cápsula de gelatina blanda, un líquido no acuoso, un líquido acuoso, una suspensión, una solución, una emulsión, un jarabe, una suspensión acuosa esterilizada, una solución acuosa esterilizada, una suspensión no acuosa, una solución no acuosa y una formulación liofilizada.
- 30 9. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde la composición farmacéuticamente aceptable comprende NMN o una sal del mismo.
- 35 10. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde la composición farmacéuticamente aceptable comprende NMN.
- 40 11. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el NMN o la sal del mismo se administra a una dosis de 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1200 mg, 1300 mg, 1400 mg, 1500 mg, 1600 mg, 1700 mg, 1800 mg, 1900 mg, 2000 mg, 2100 mg, 2200 mg, 2300 mg, 2400 mg, 2500 mg, aproximadamente 2500 mg, 2600 mg, 2700 mg, 2800 mg, 2900 mg, 3000 mg, 3500 mg, 4000 mg, 4500 mg, 5000 mg, 5500 mg, 6000 mg, 6500 mg o 6800 mg a una velocidad de una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.
- 45 12. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el NMN o la sal del mismo se administra a una dosis de 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 400 mg, 450 mg o 500 mg a una velocidad de una o dos veces al día.
- 50 13. NMN o una sal del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el sujeto es un humano.

FIG. 1

TÉCNICA ANTERIOR

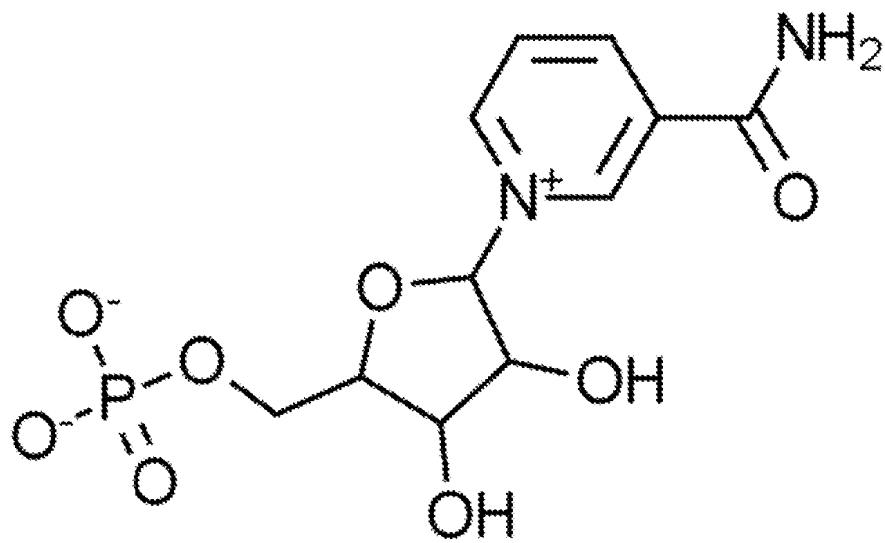


FIG. 2
Peso corporal promedio

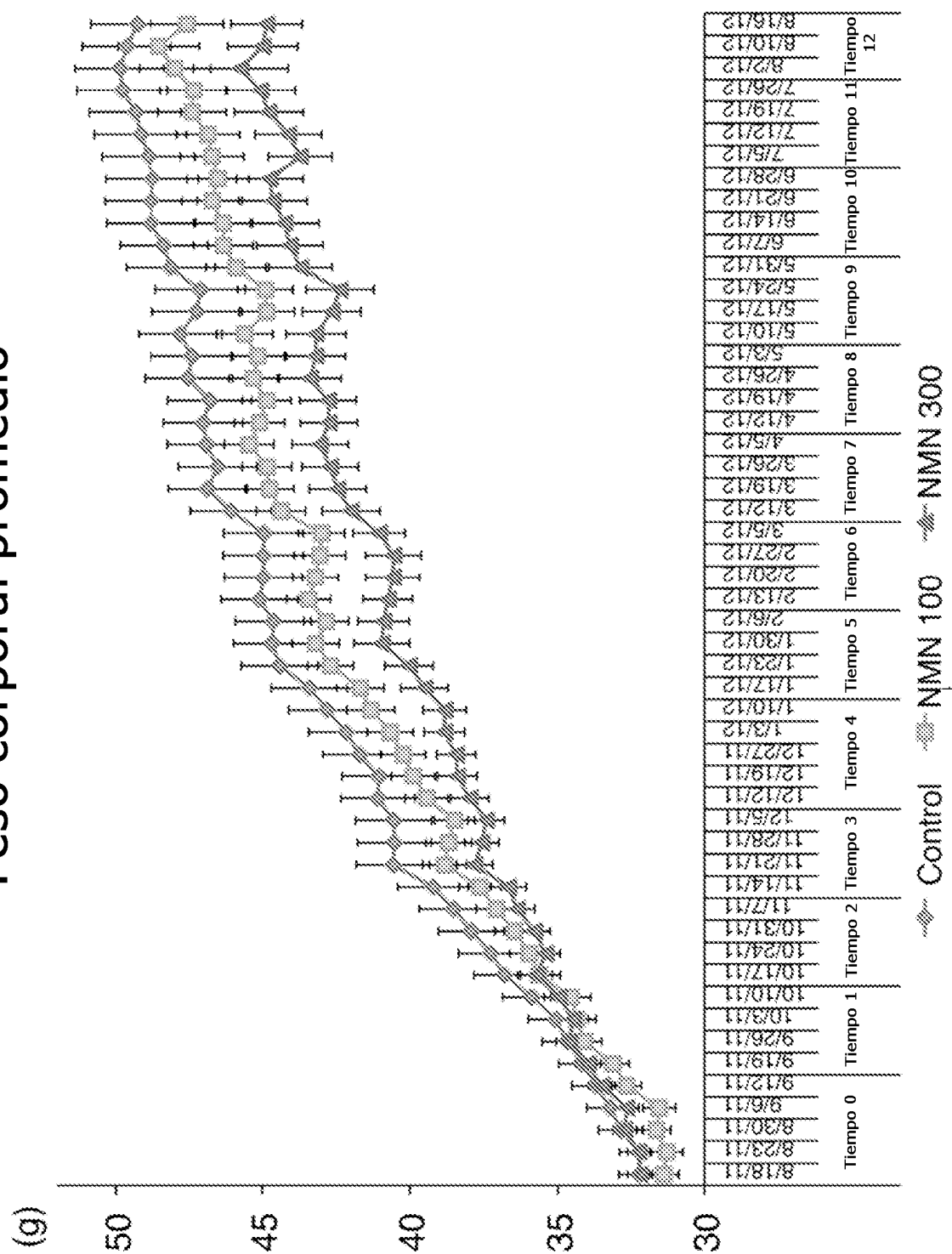
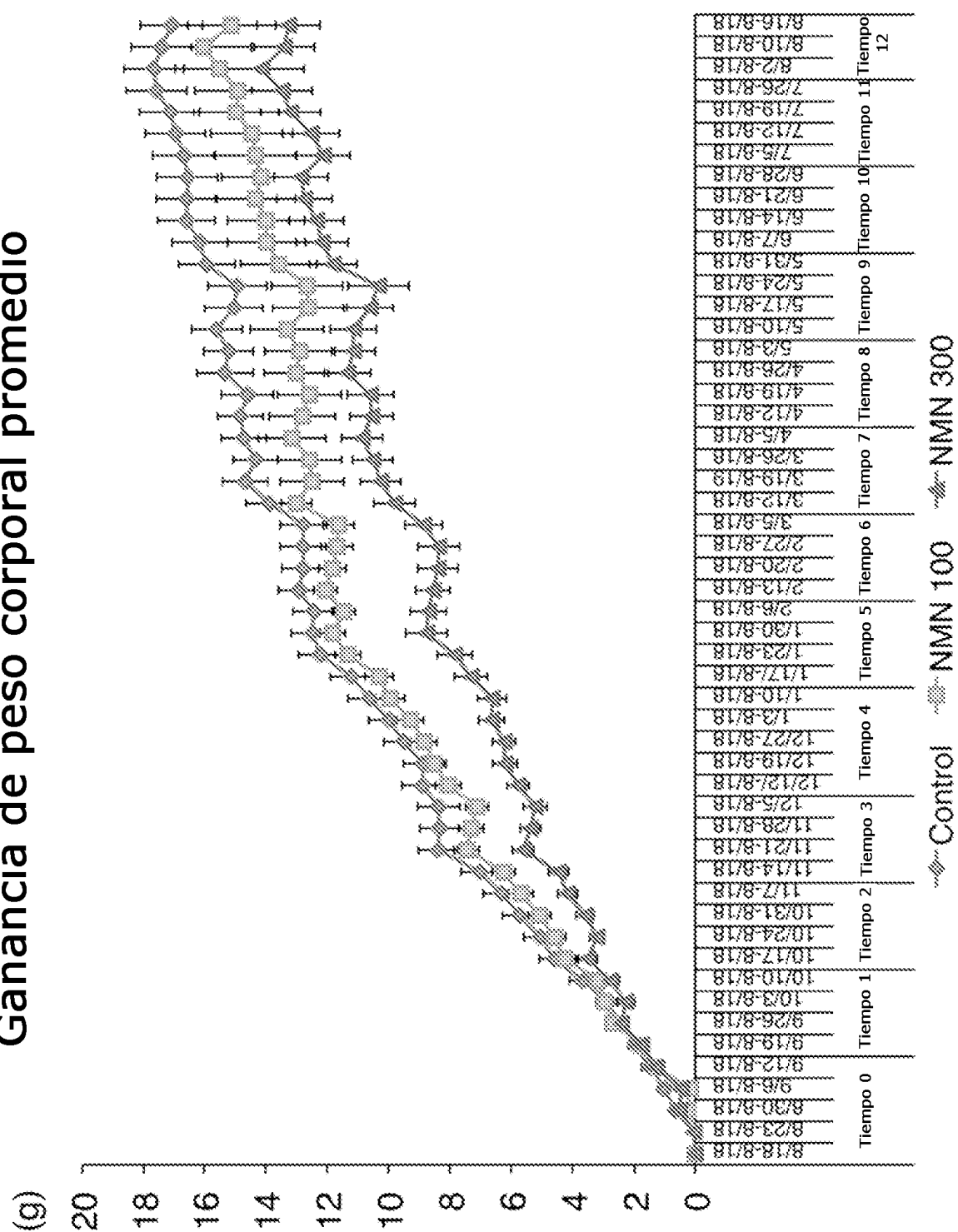


FIG. 3
Ganancia de peso corporal promedio



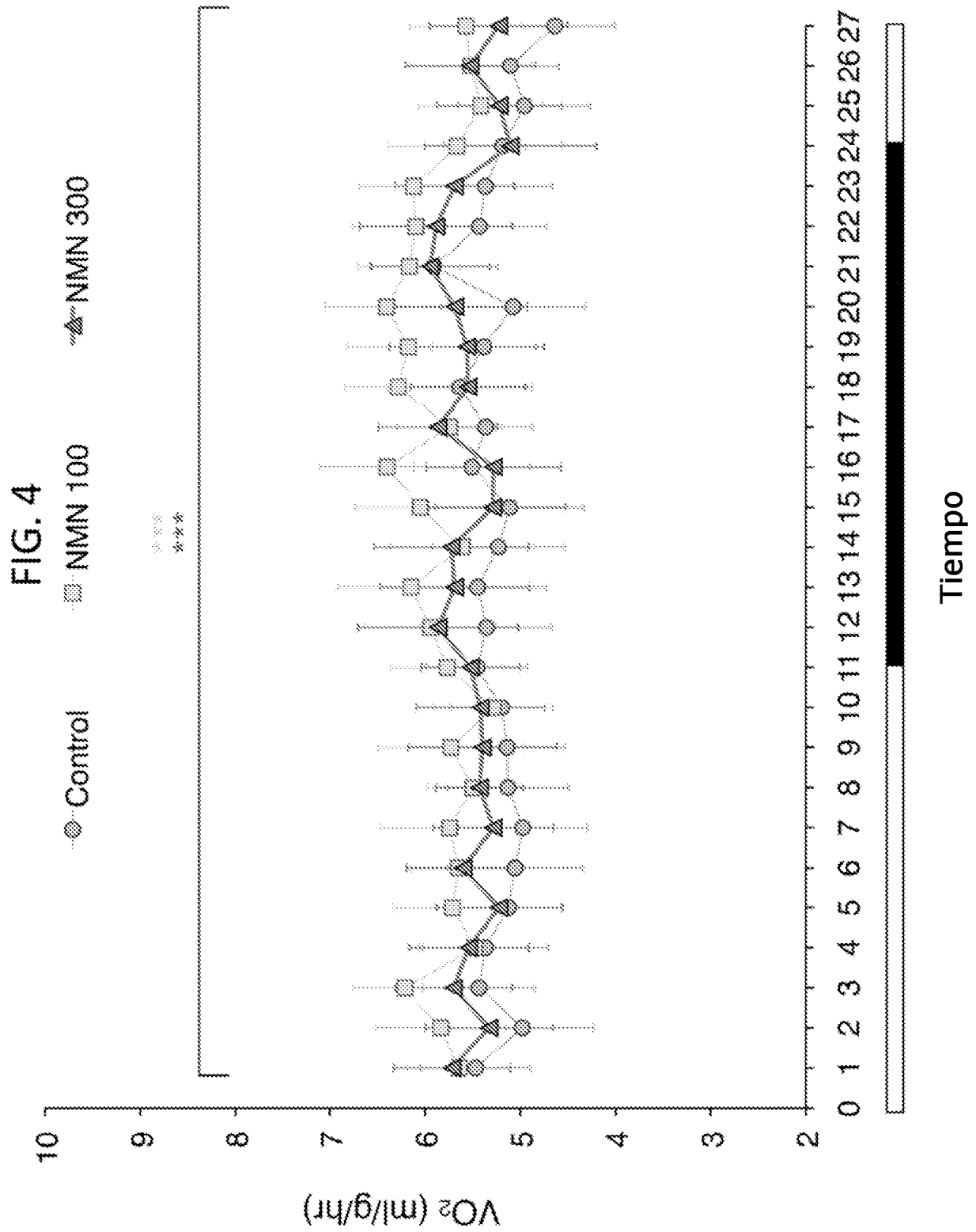


FIG. 5

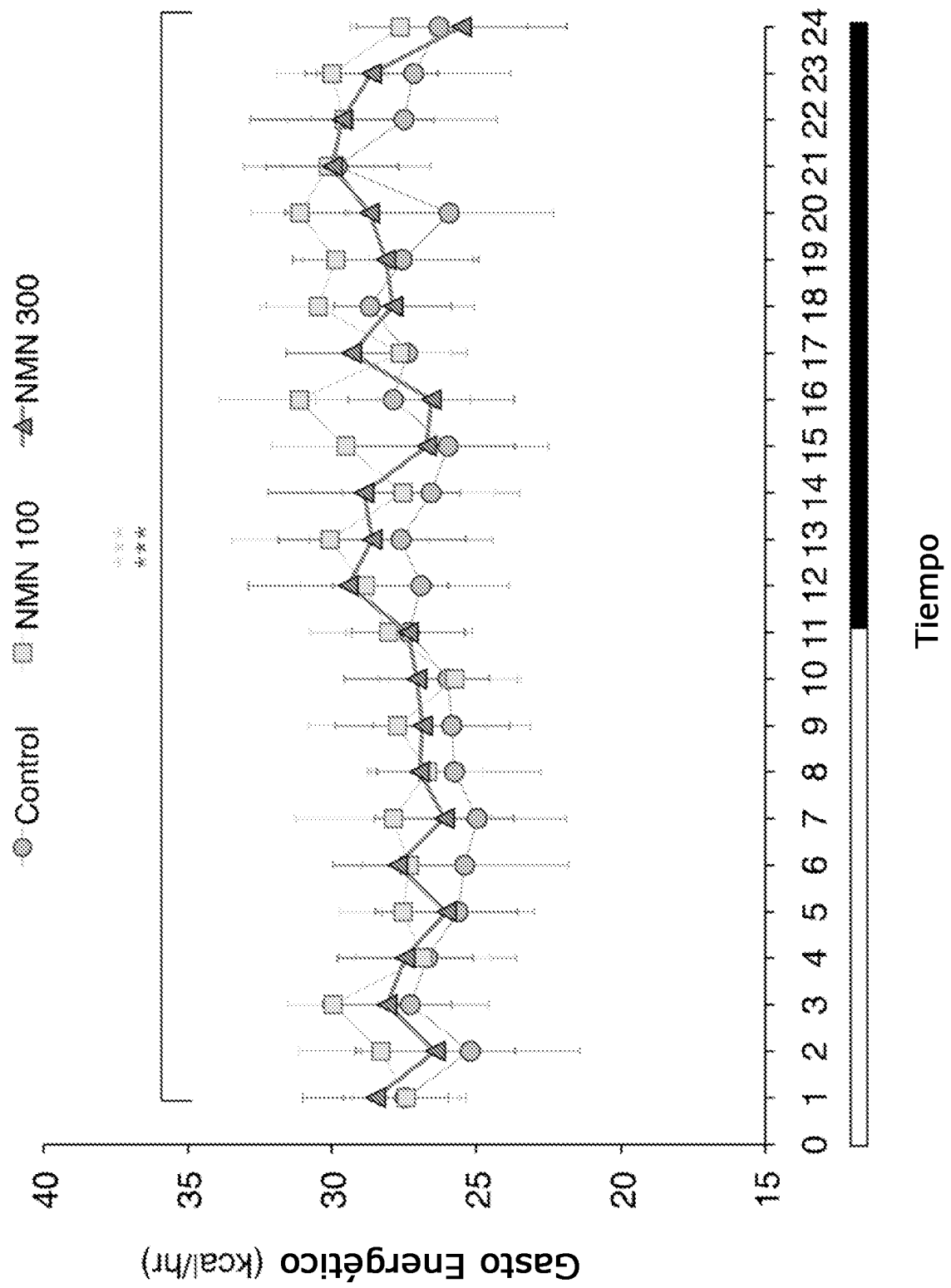


FIG. 6

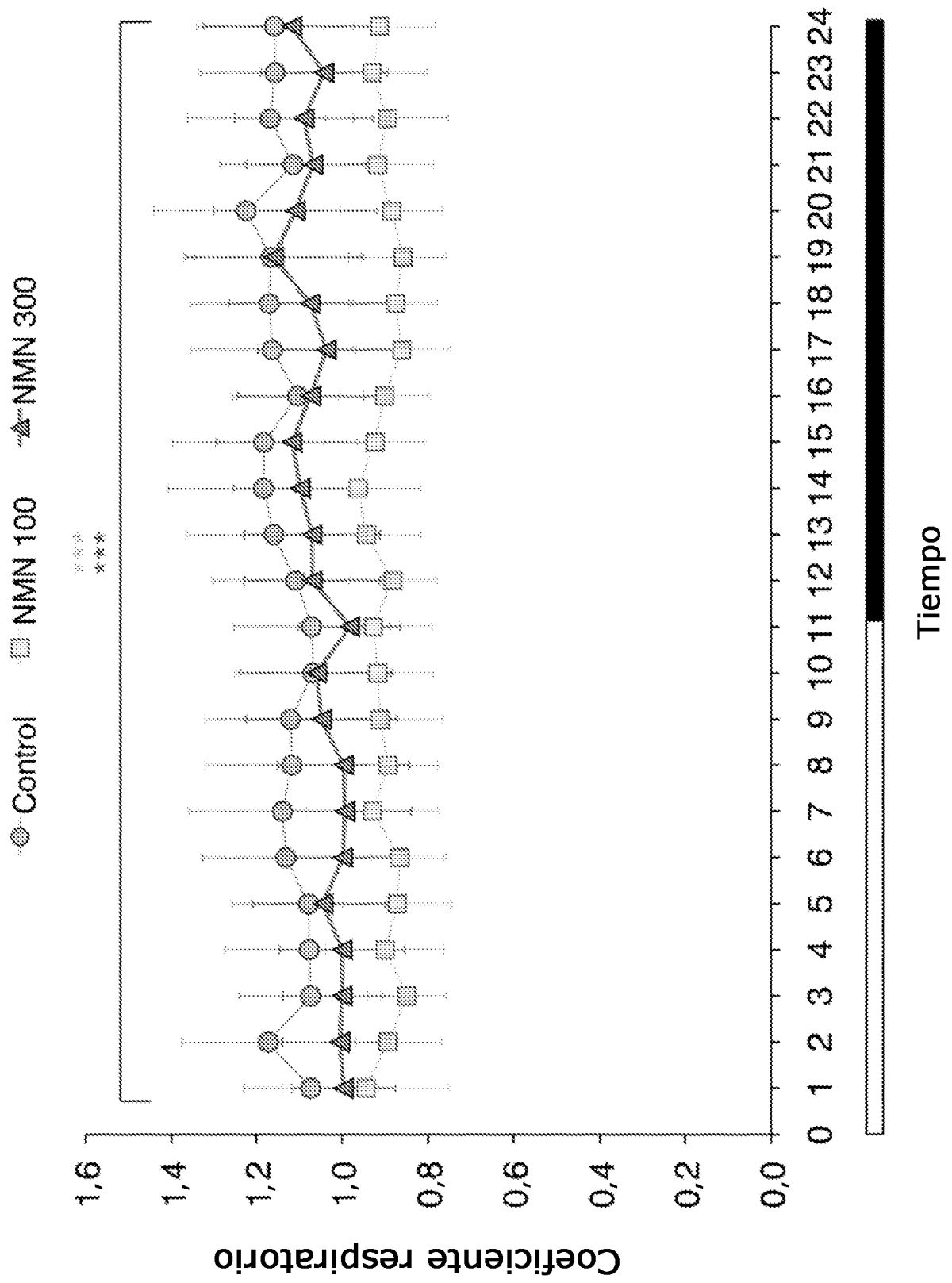


FIG. 7 A-C

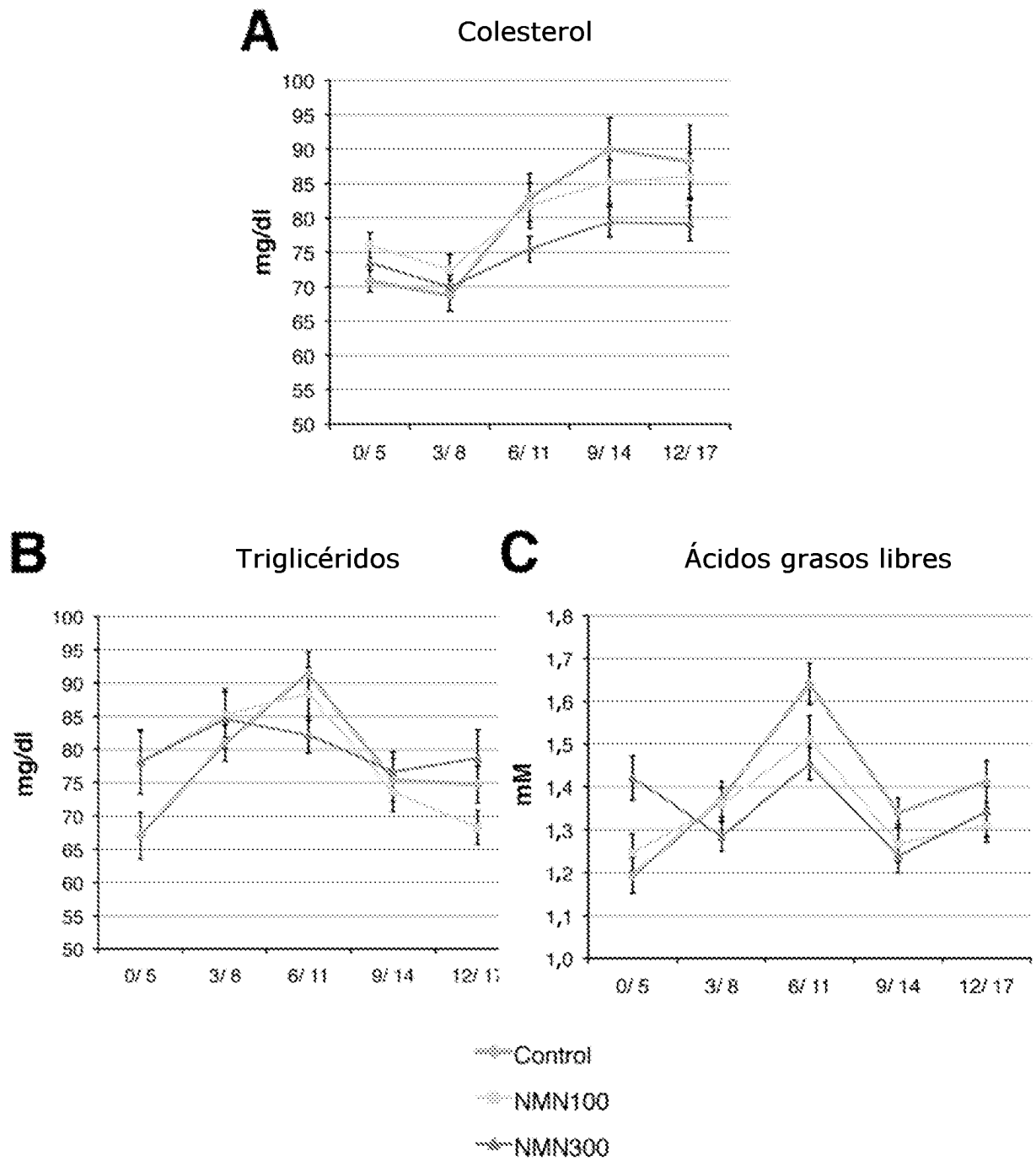


FIG. 8 A-C

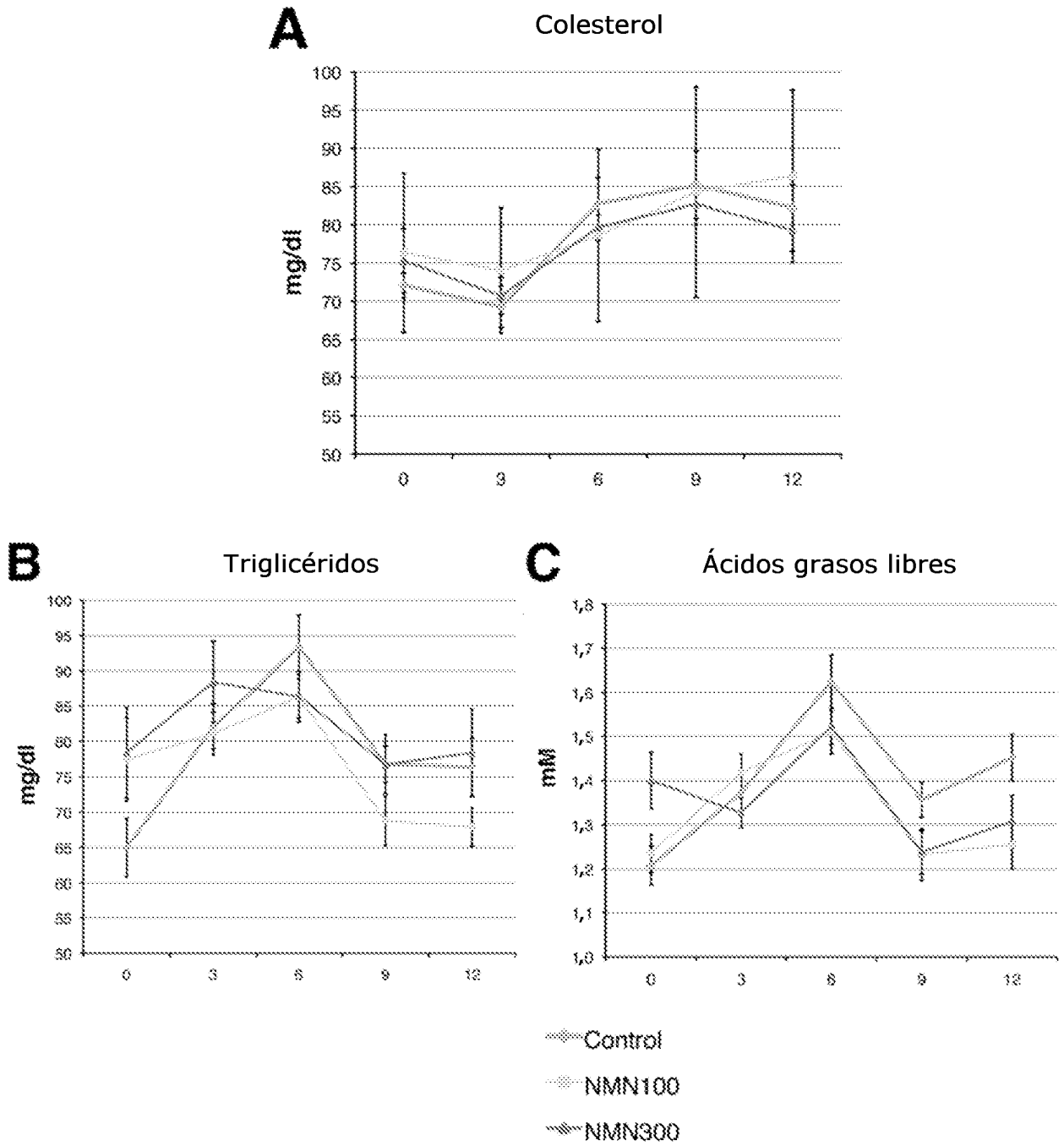
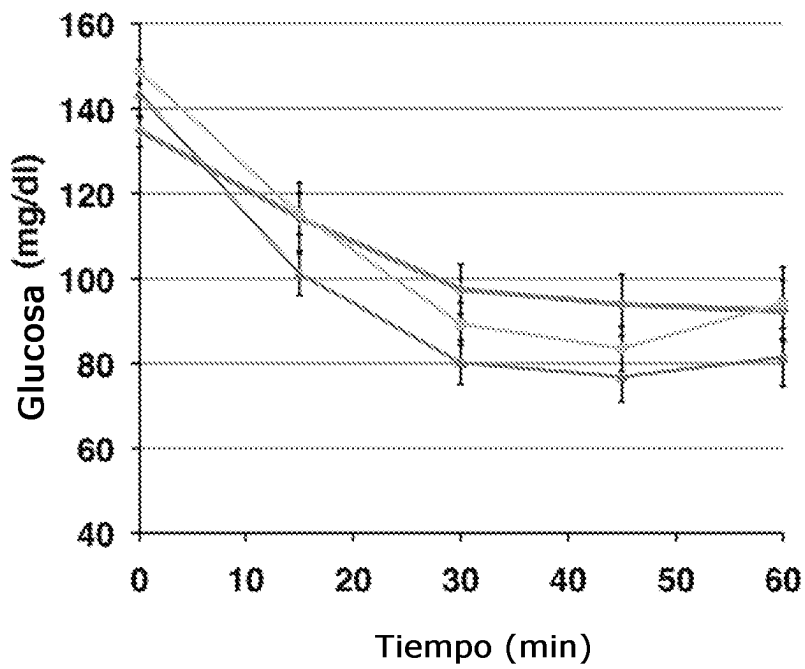


FIG. 9 A-B

A



B

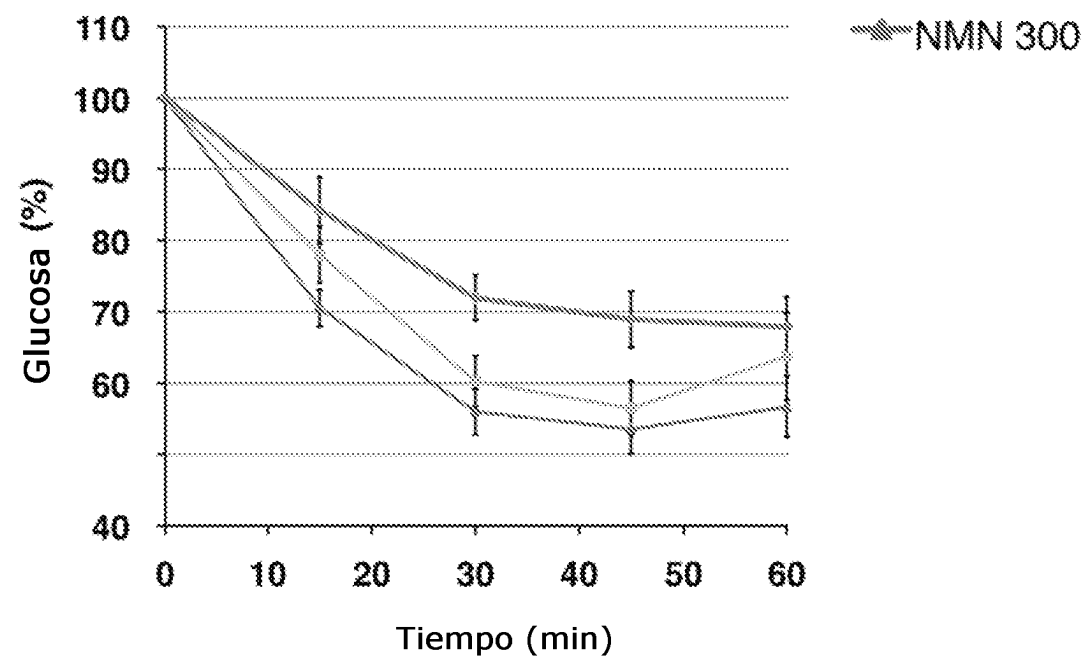


FIG. 10

FIG. 10

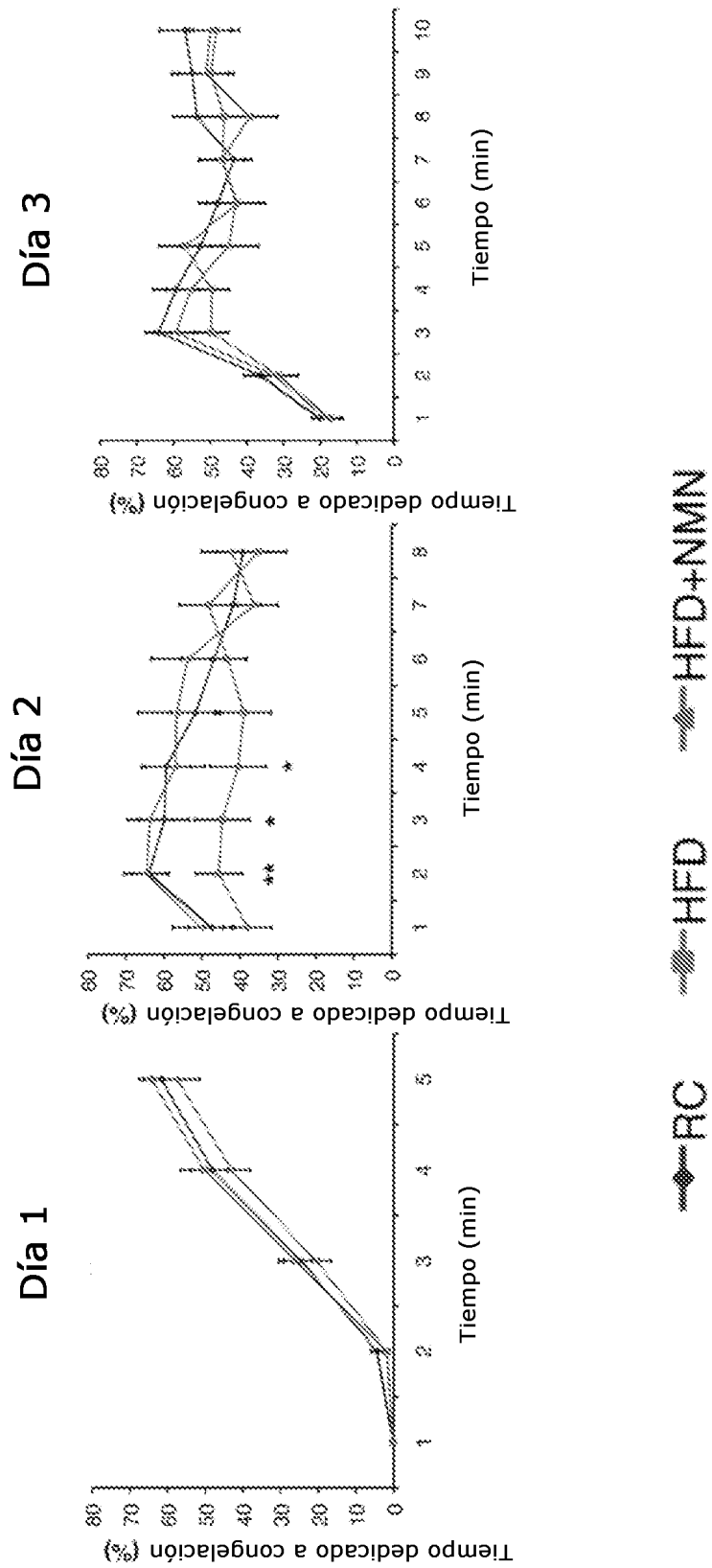
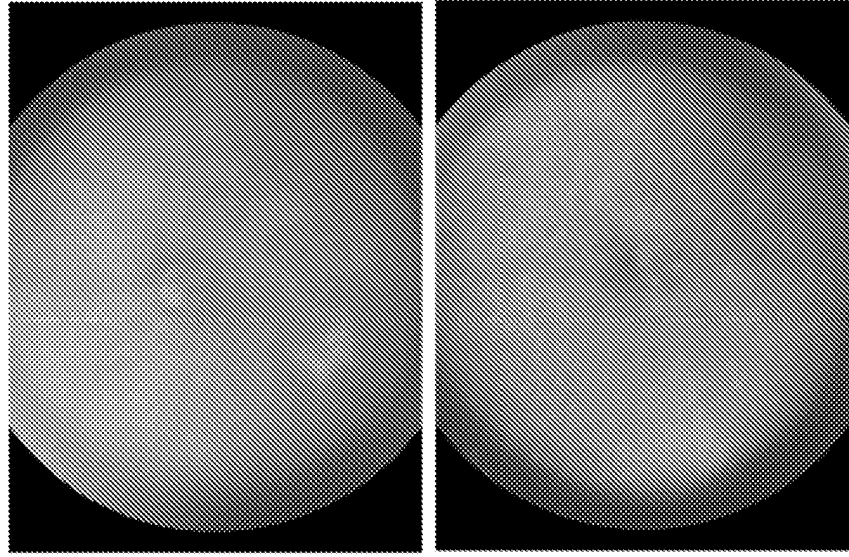
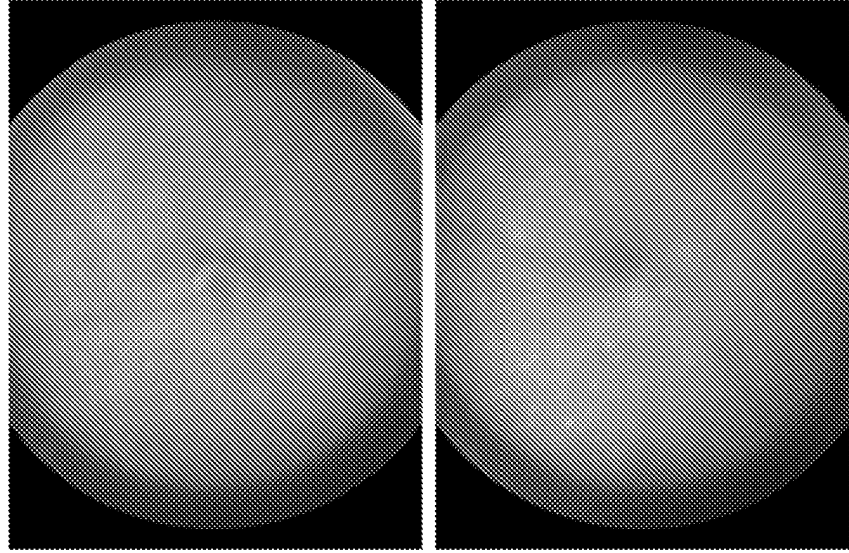


FIG. 11

NMN 300



NMN 100



Control

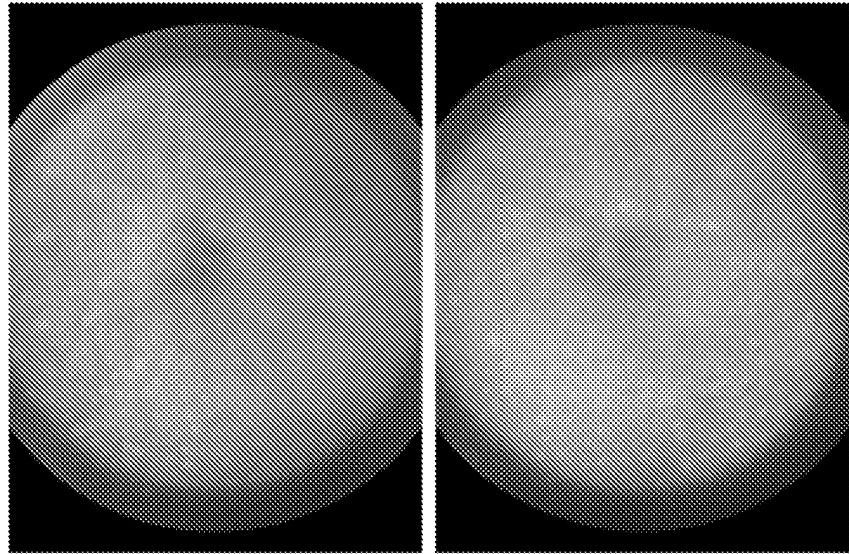


FIG. 12 A-C

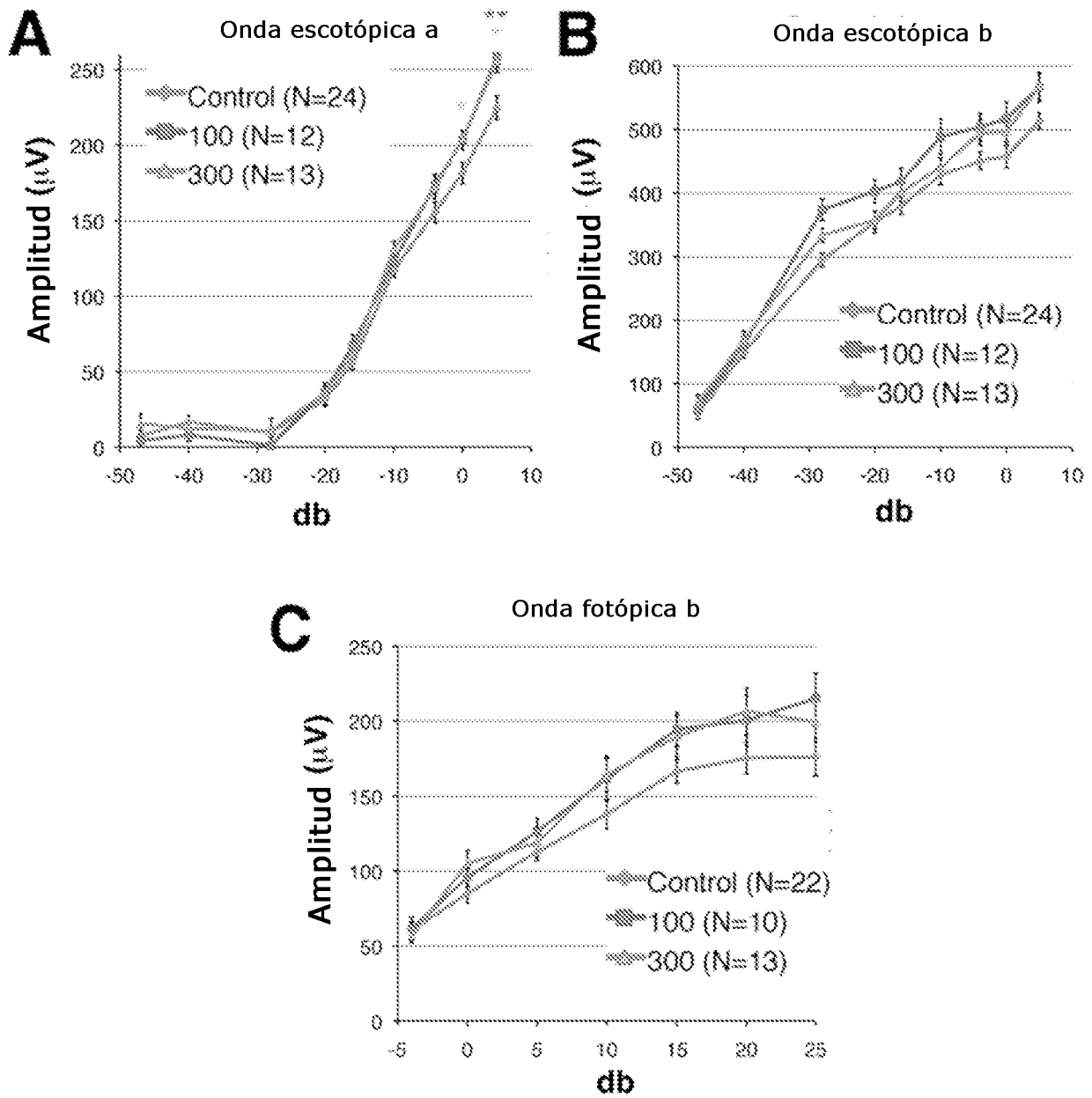


FIG. 13

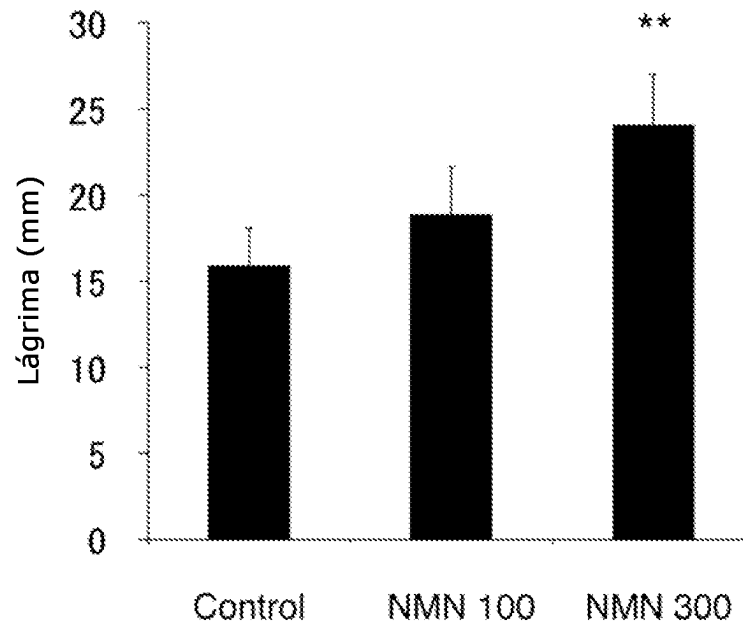


FIG. 14 A

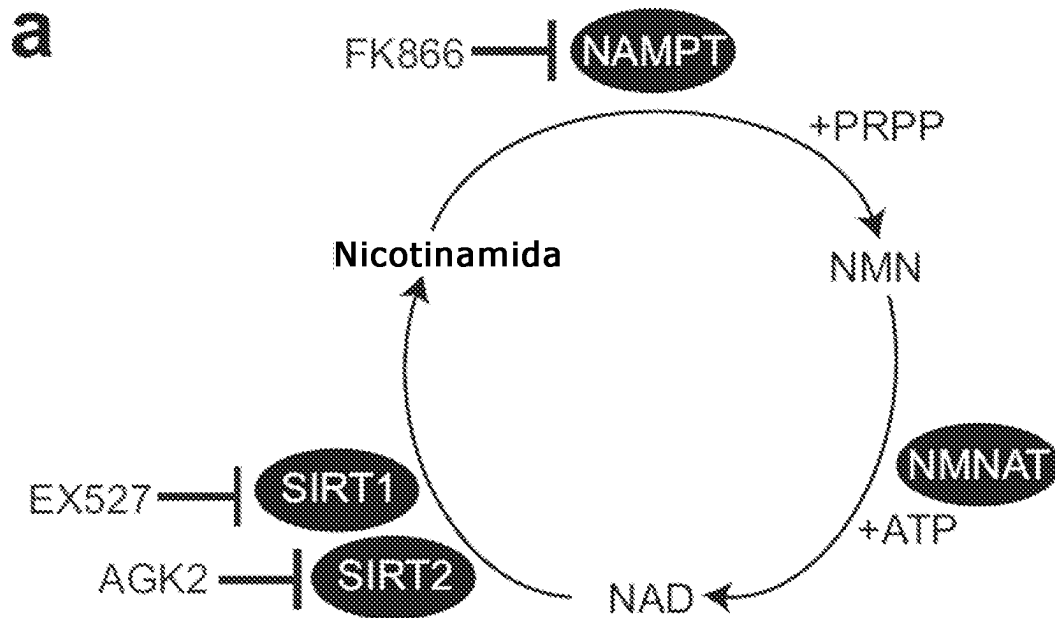


FIG. 14 B-C

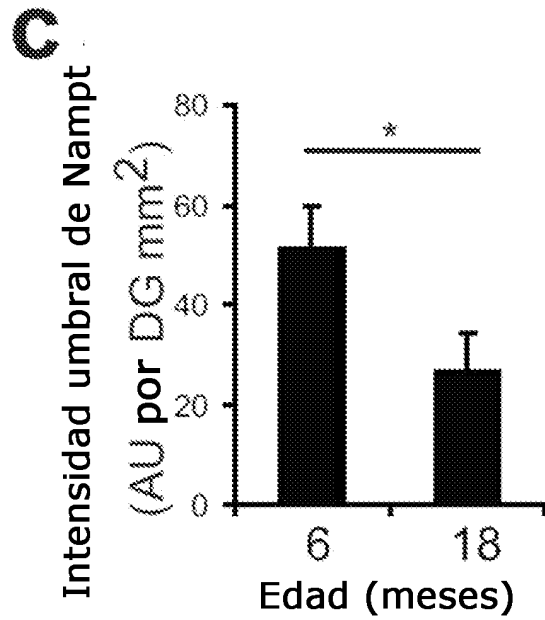
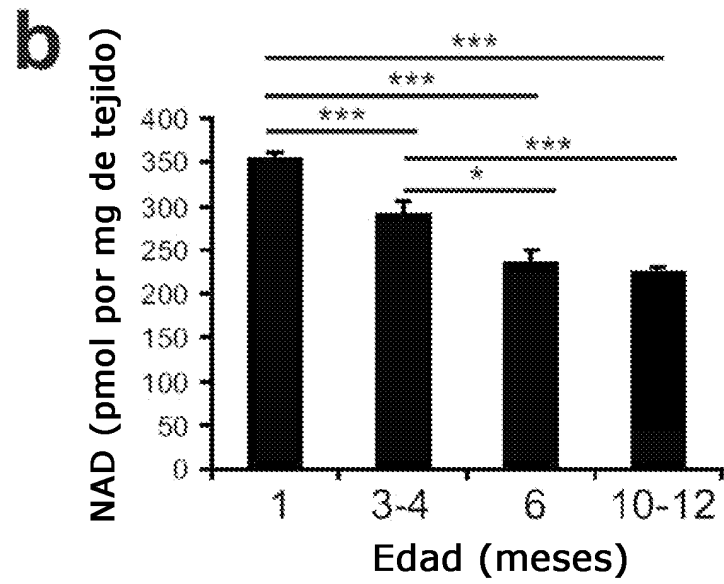


FIG. 14 D

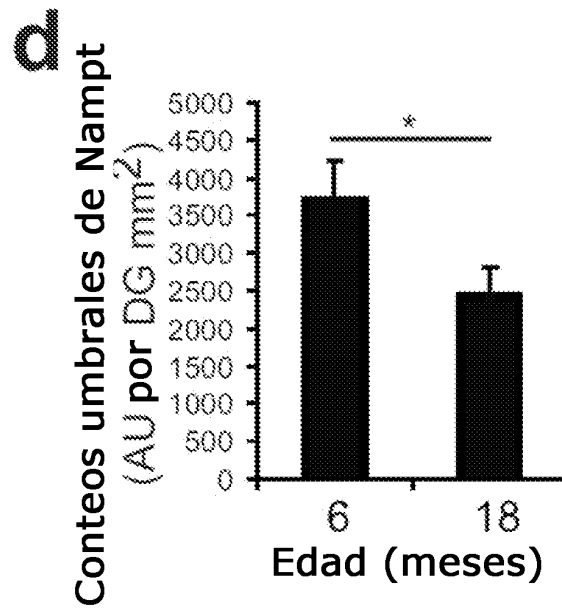


FIG. 14 E

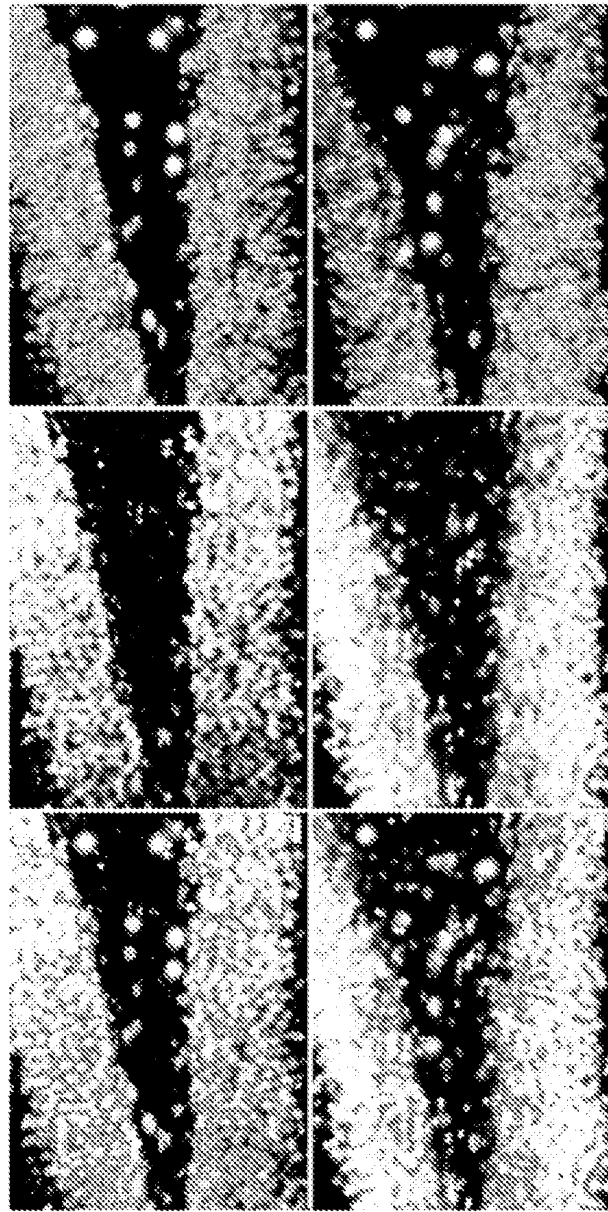


FIG. 15 A-B

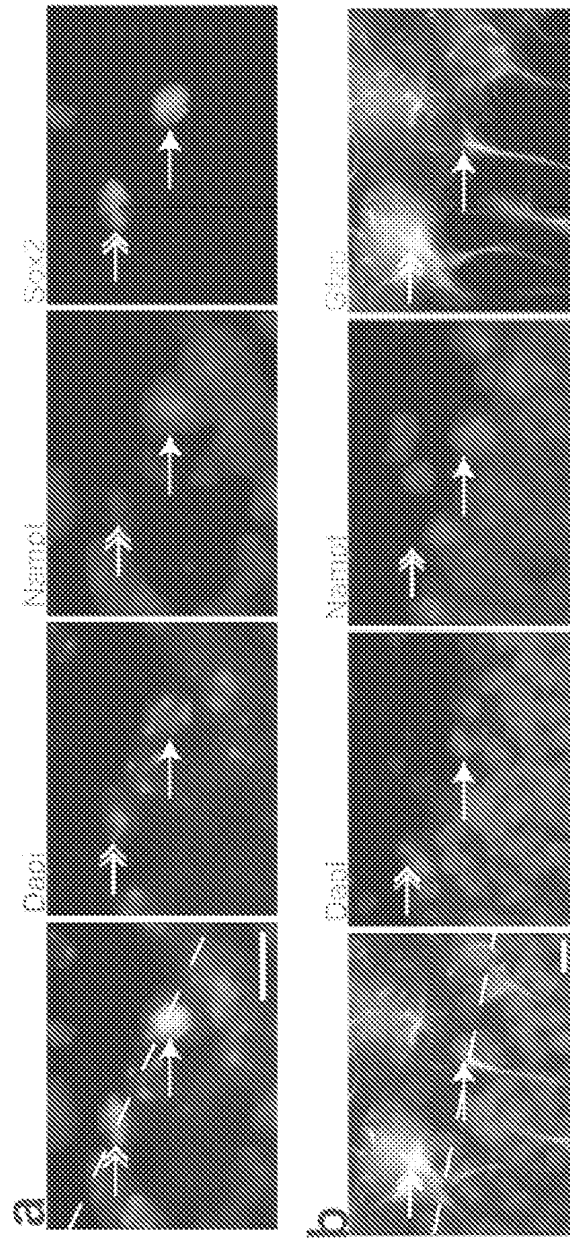


FIG. 15 C

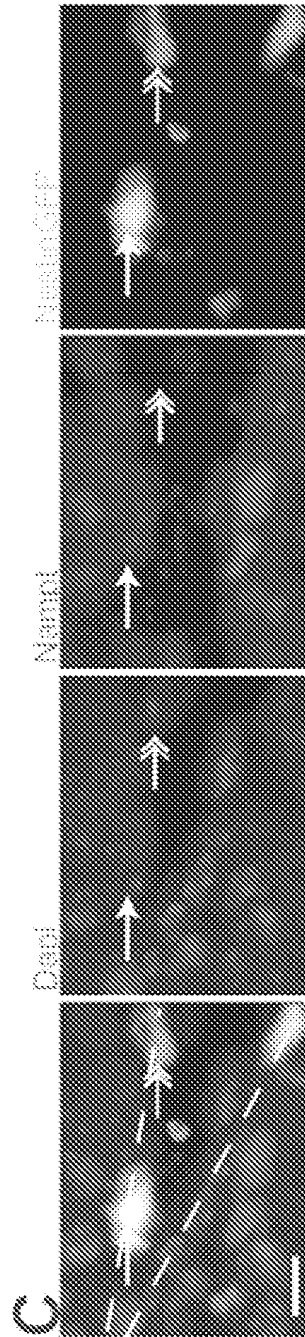


FIG. 15 D-F

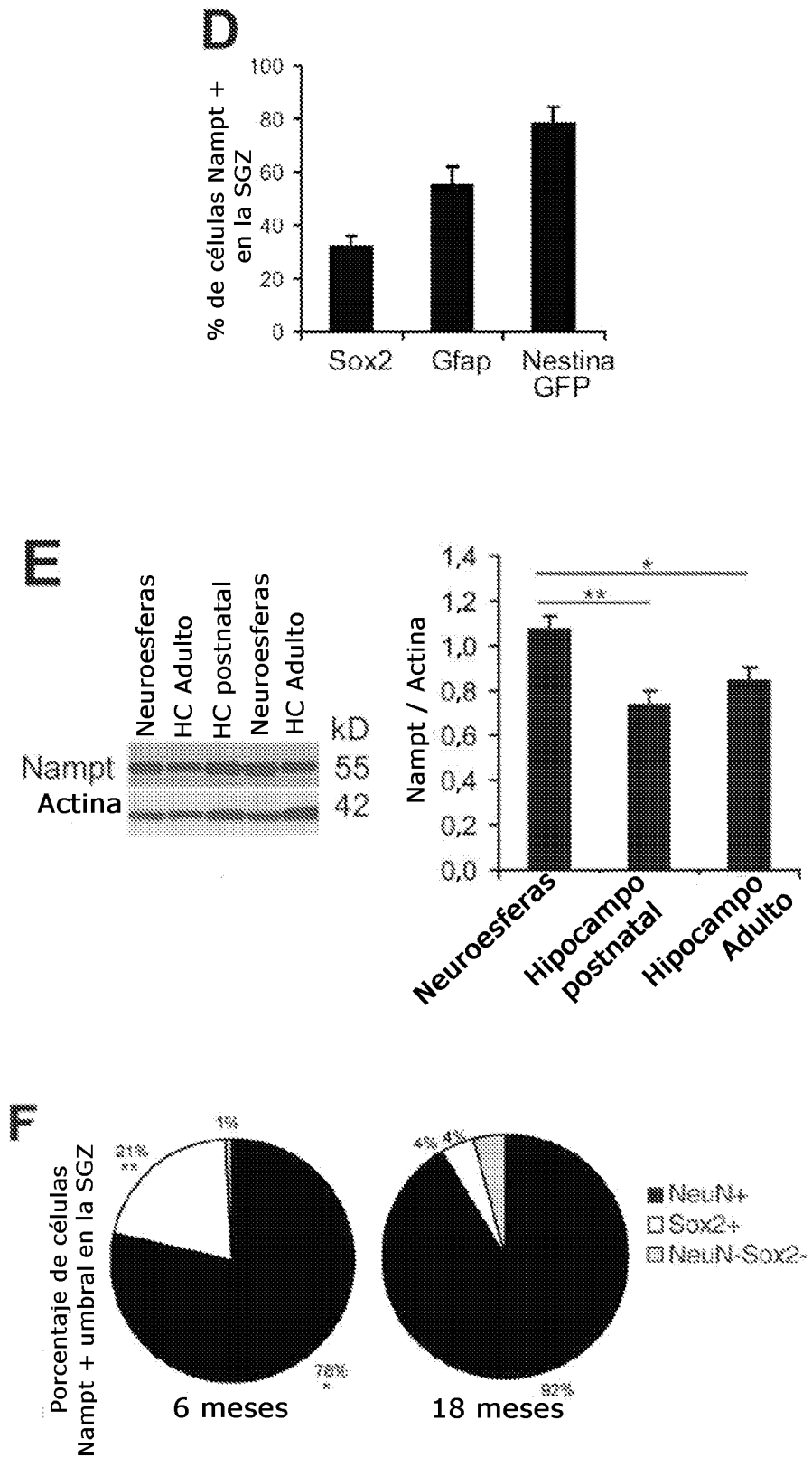


FIG. 16 A-D

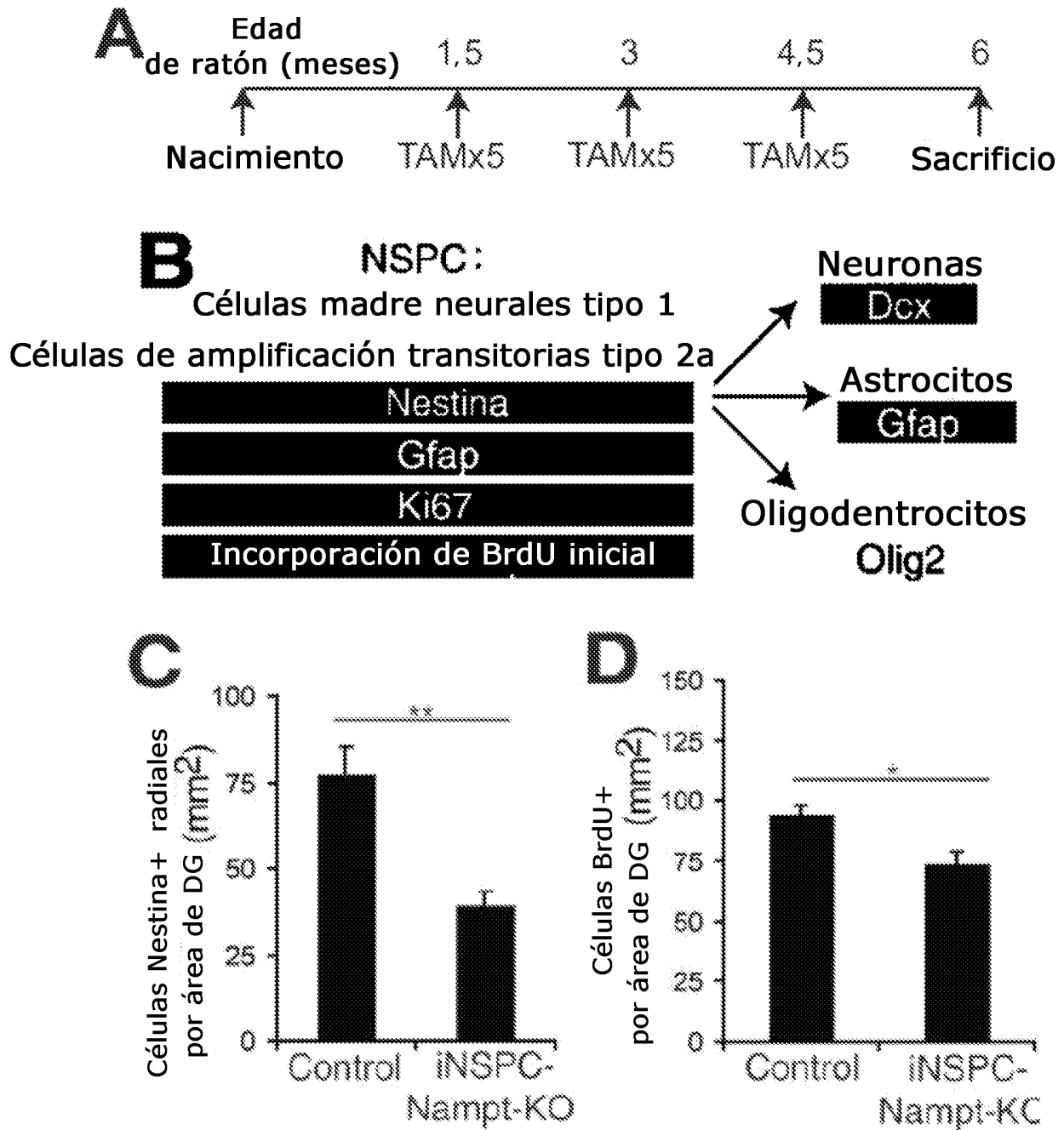
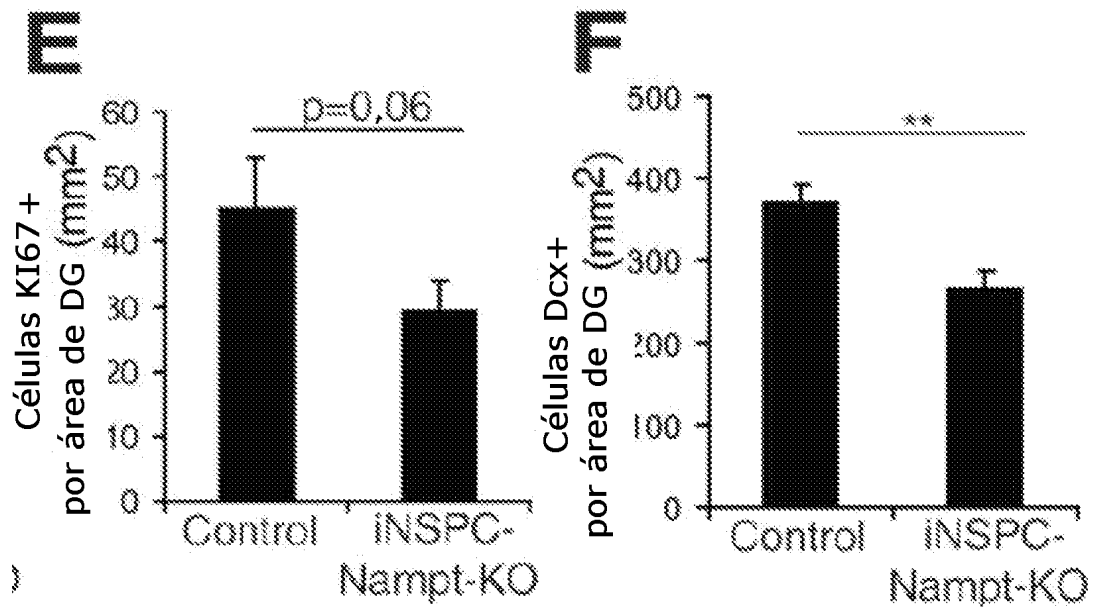


FIG. 16 E-F



G

FIG. 16 G

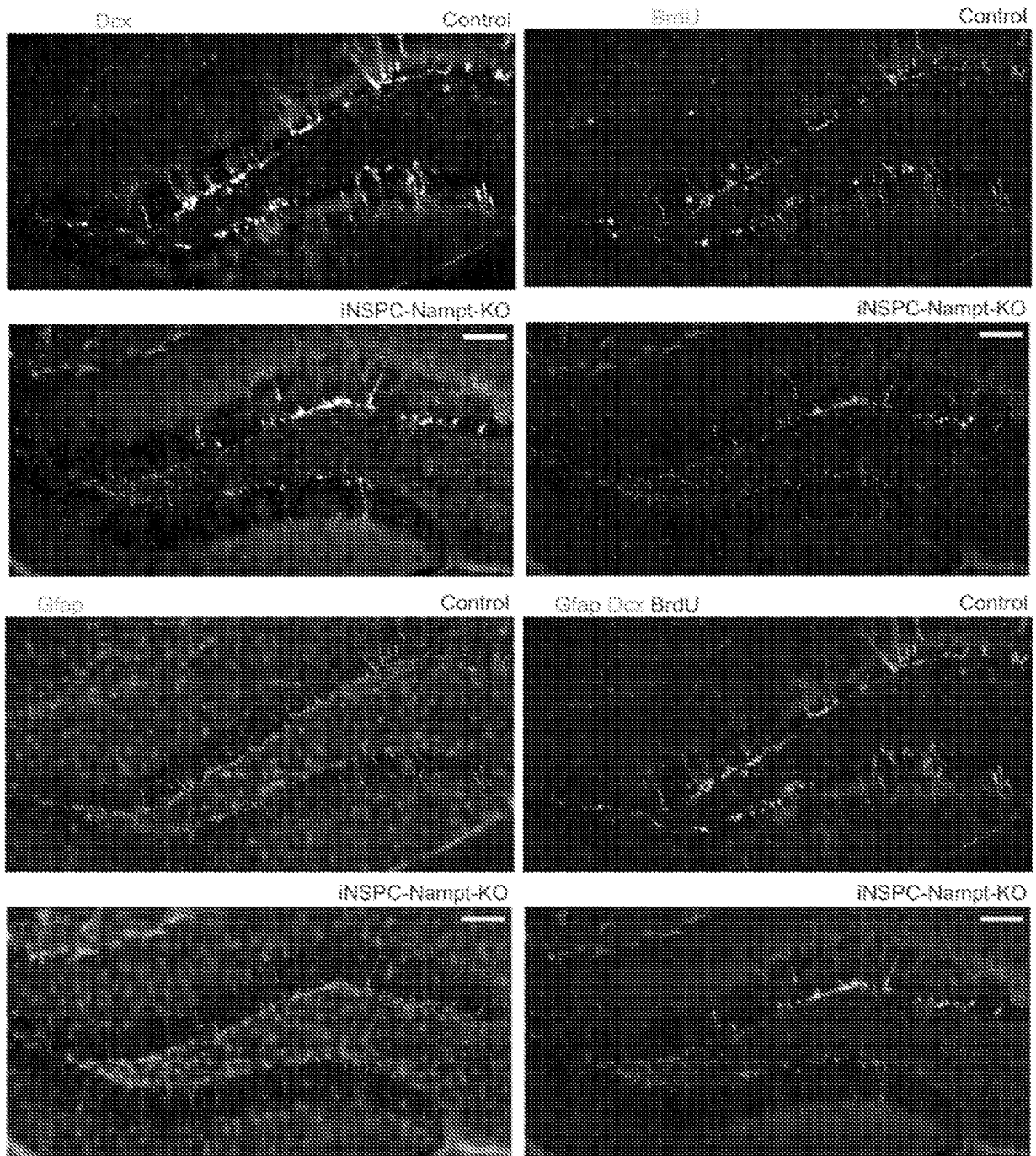


FIG. 16 H-J

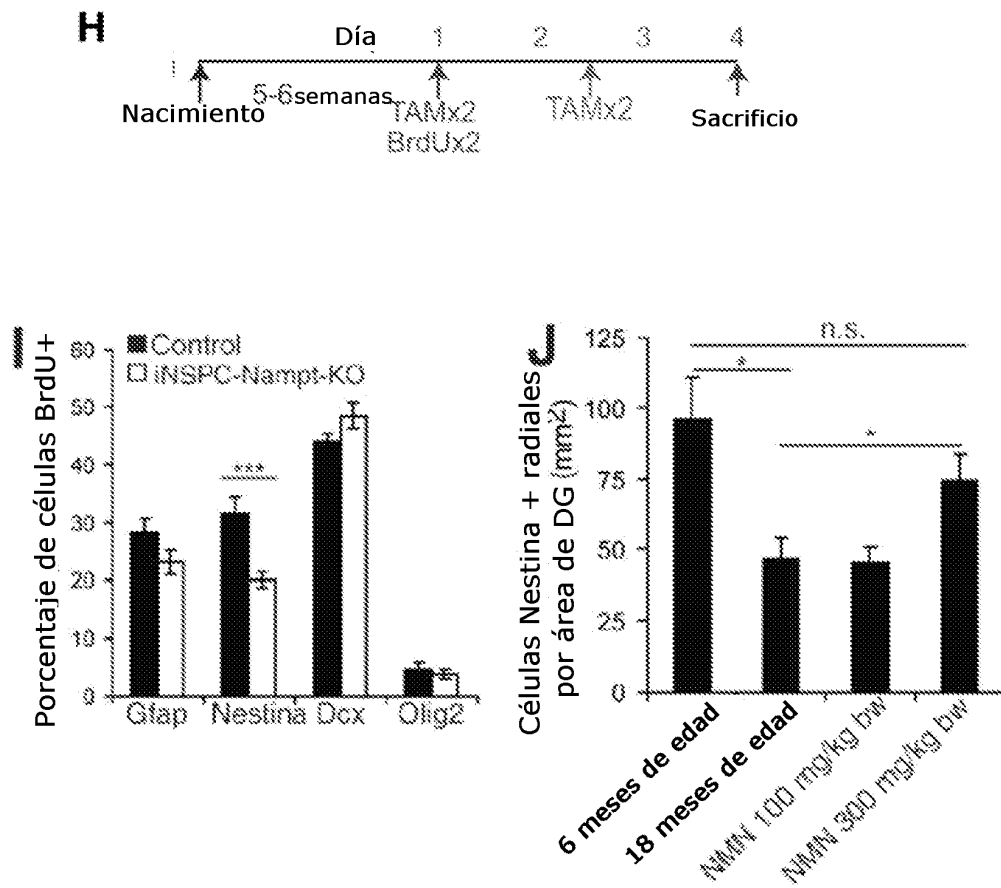


FIG. 17 A-B

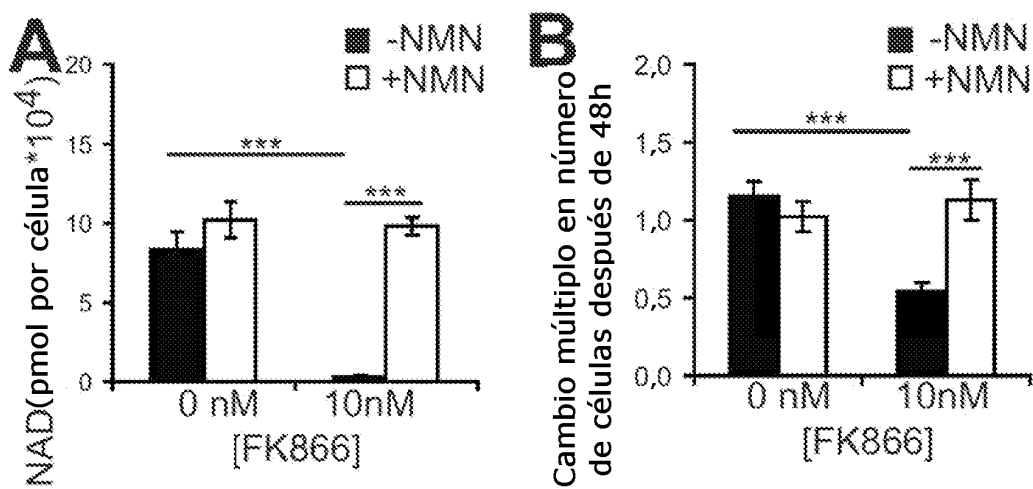


FIG. 17 C-D

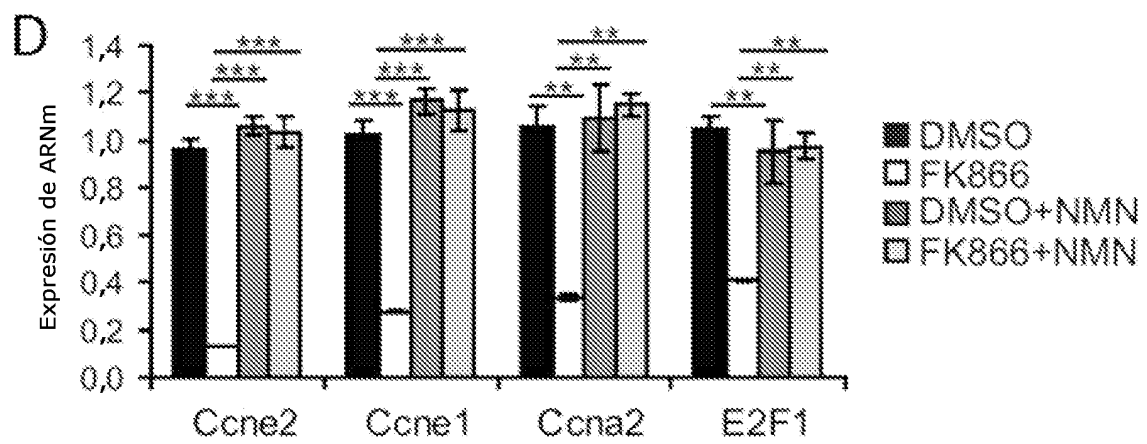
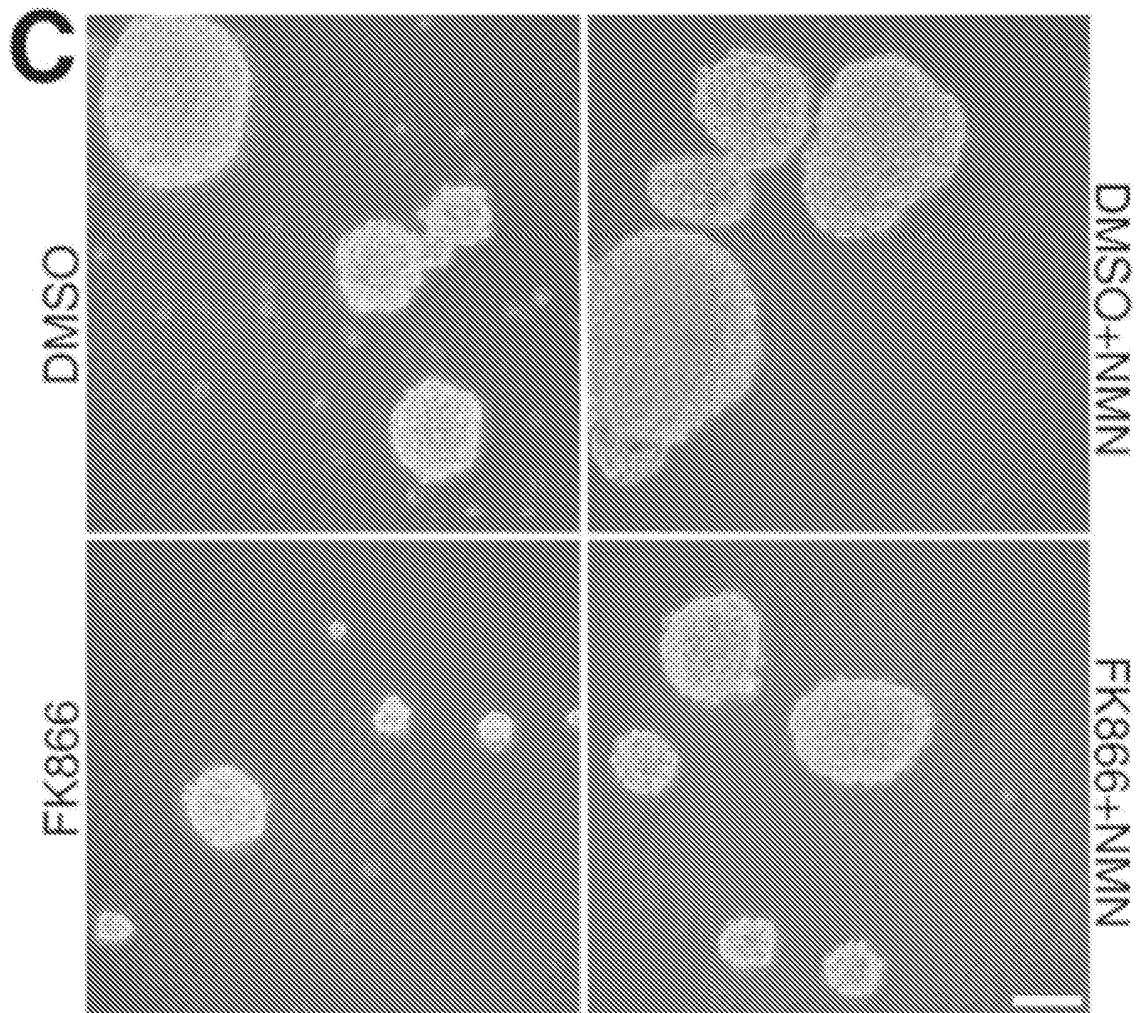


FIG. 17 E

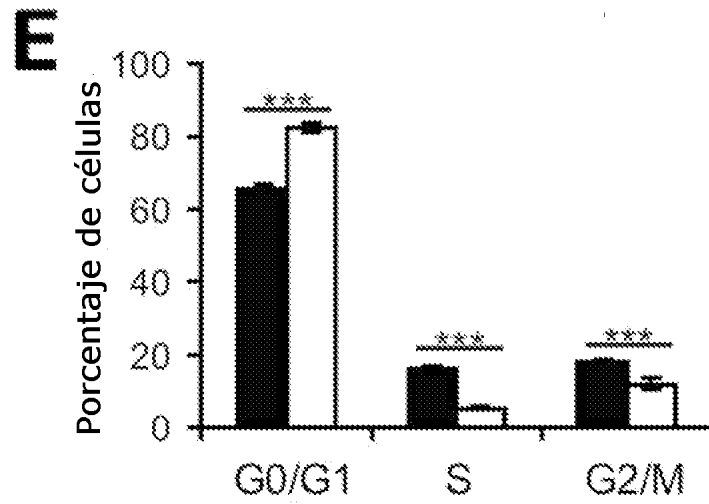


FIG. 18 A

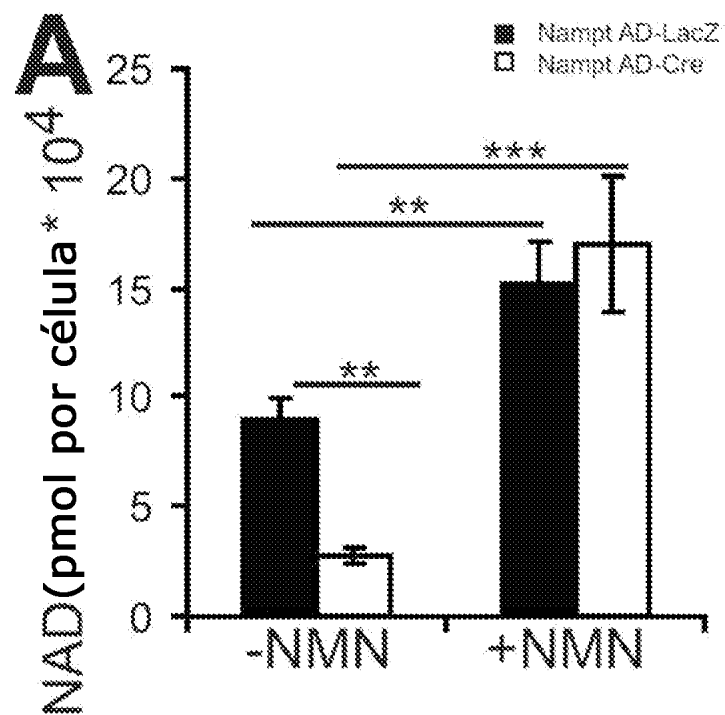


FIG. 18 A-C

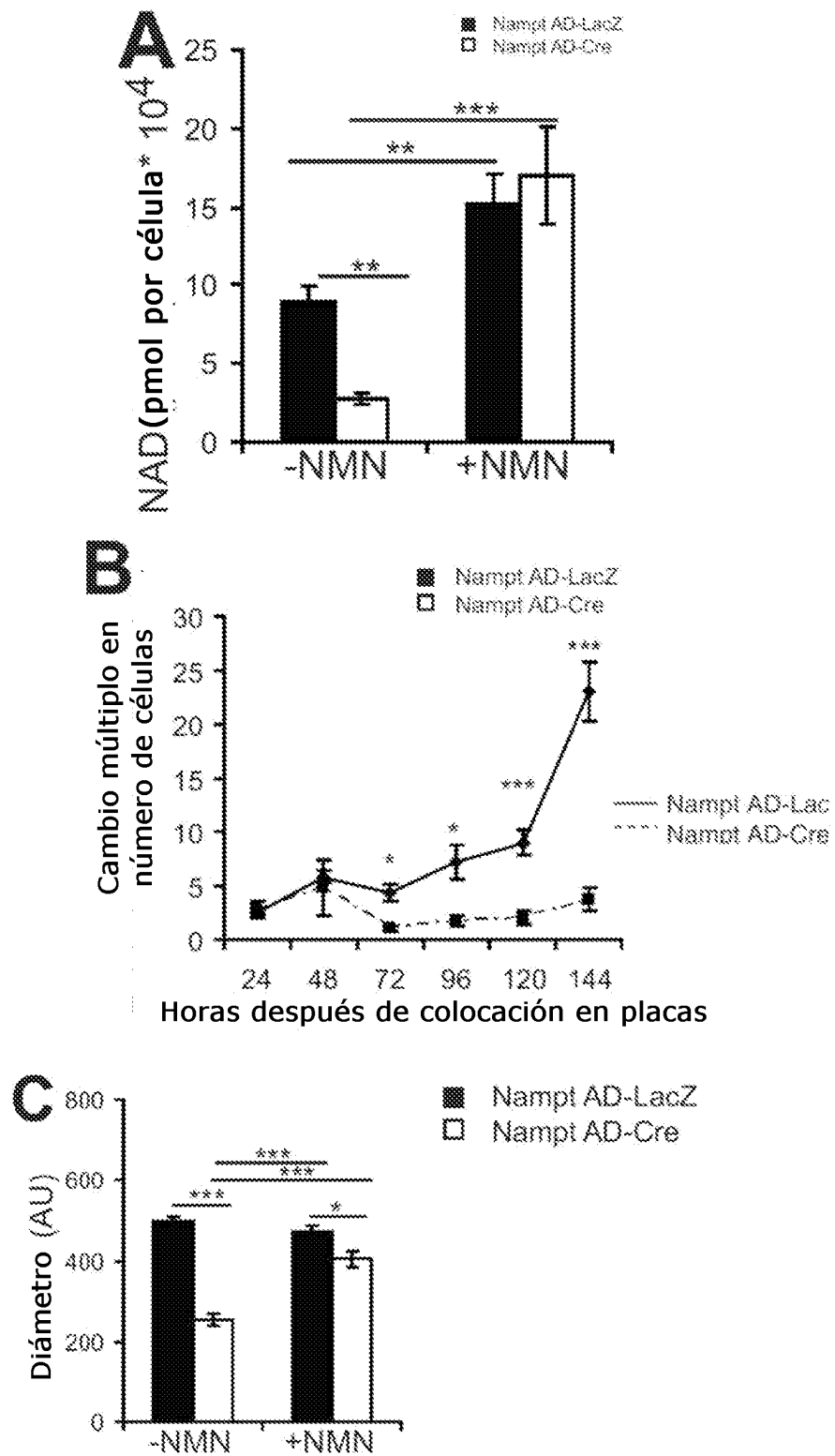


FIG. 18 D

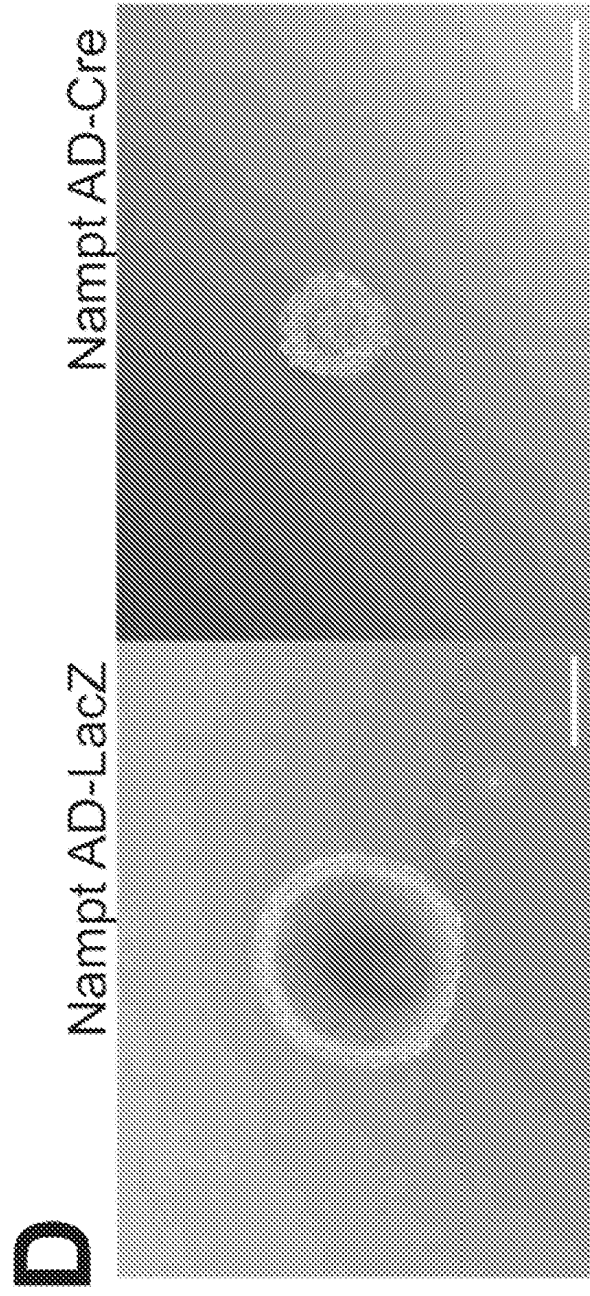


FIG. 18E-G

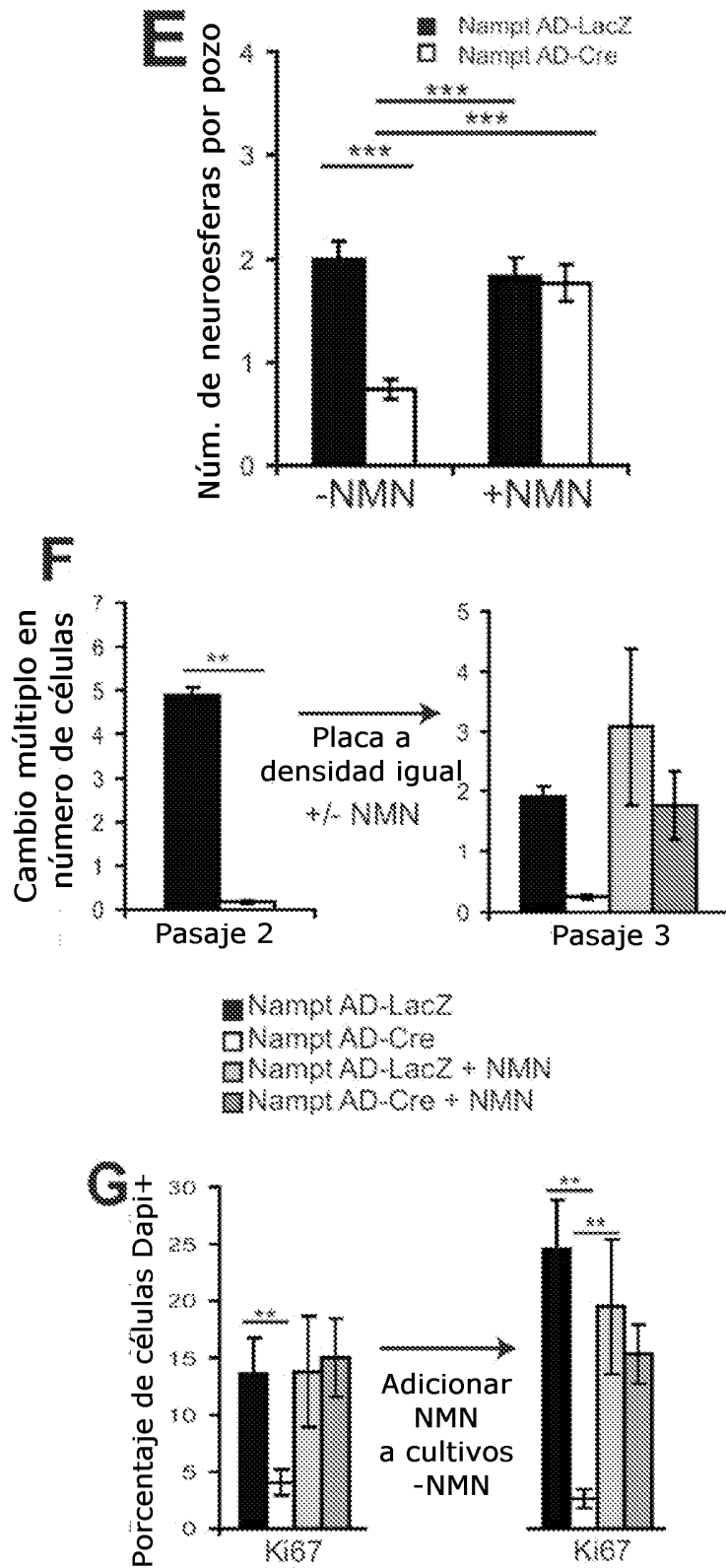
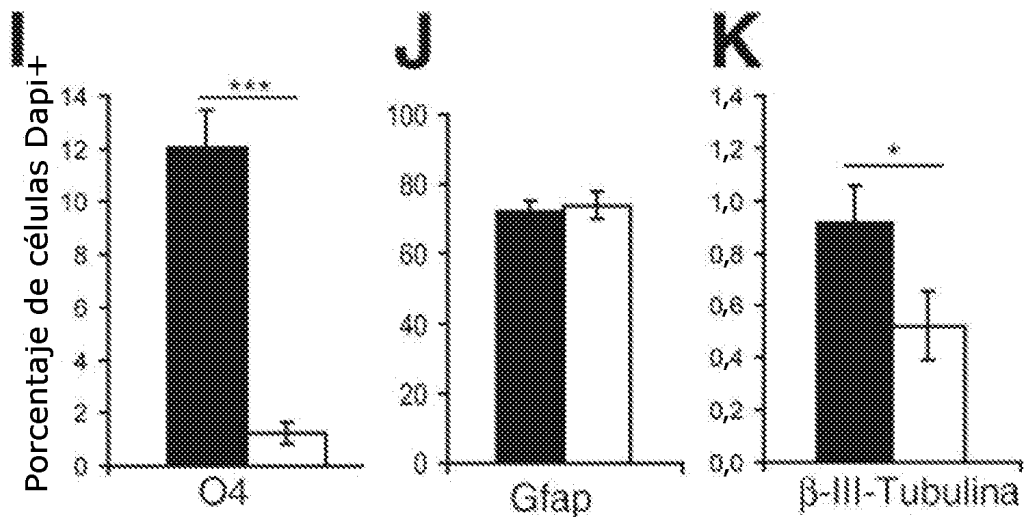
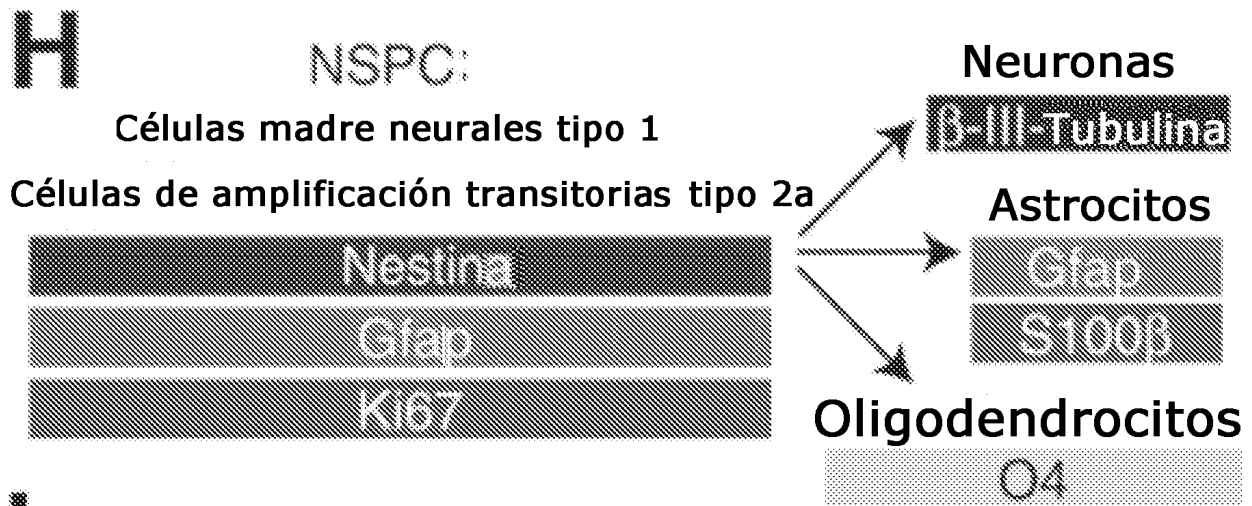


FIG. 18 H-K



■ Nampt AD-LacZ
 □ Nampt AD-Cre
 ■ Nampt AD-LacZ + NMN
 ■ Nampt AD-Cre + NMN

FIG. 18 L

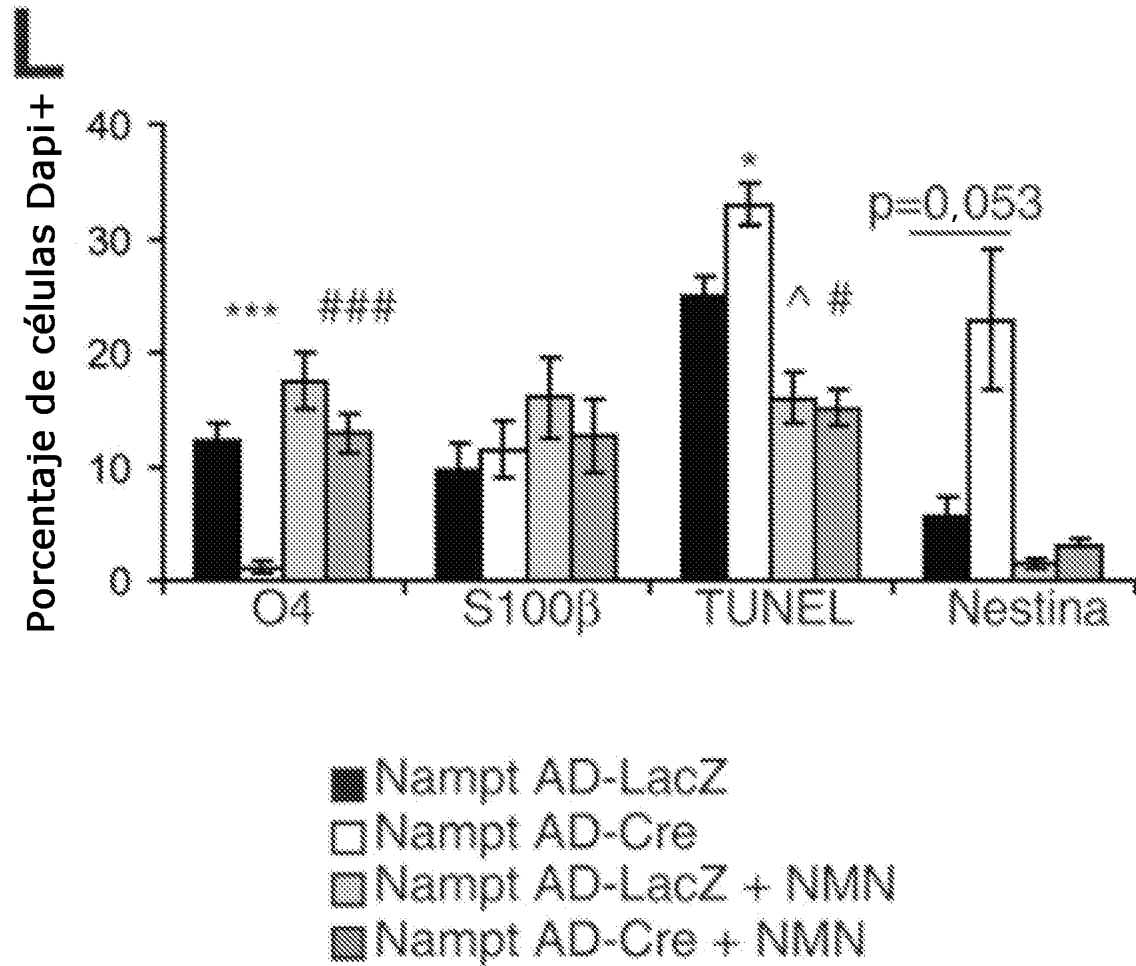


FIG. 19 A

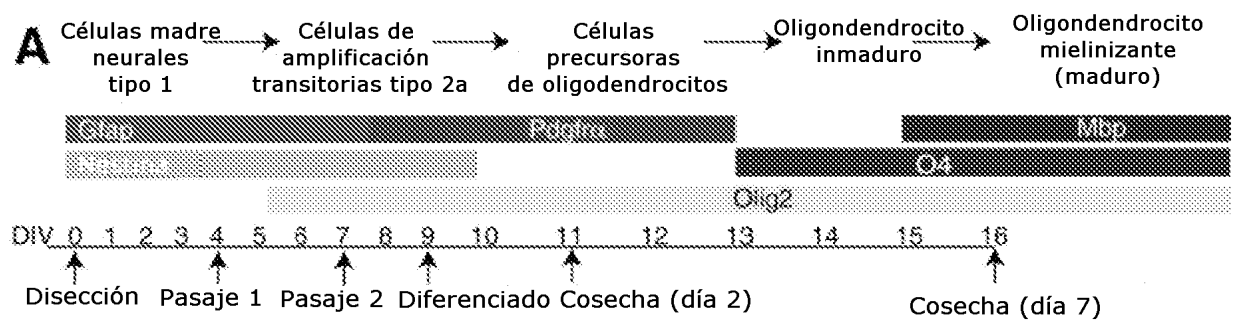


FIG. 19 B-C

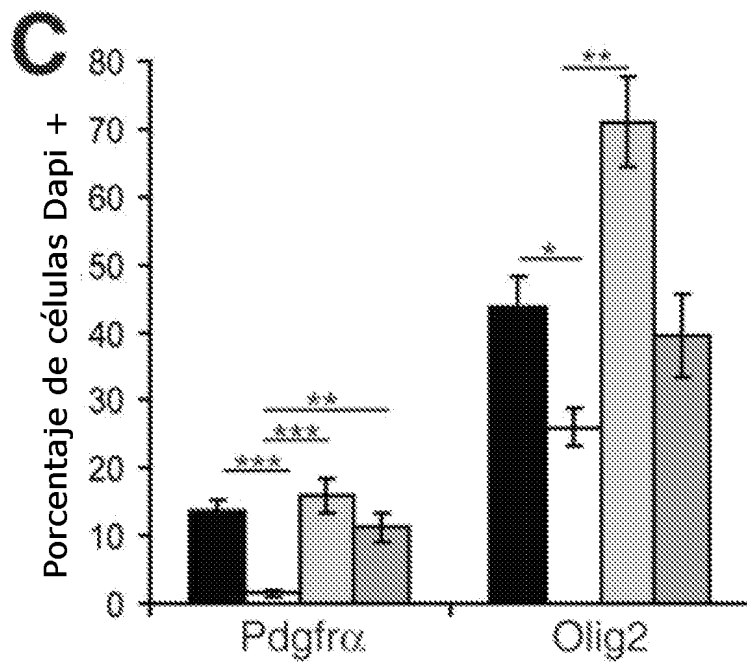
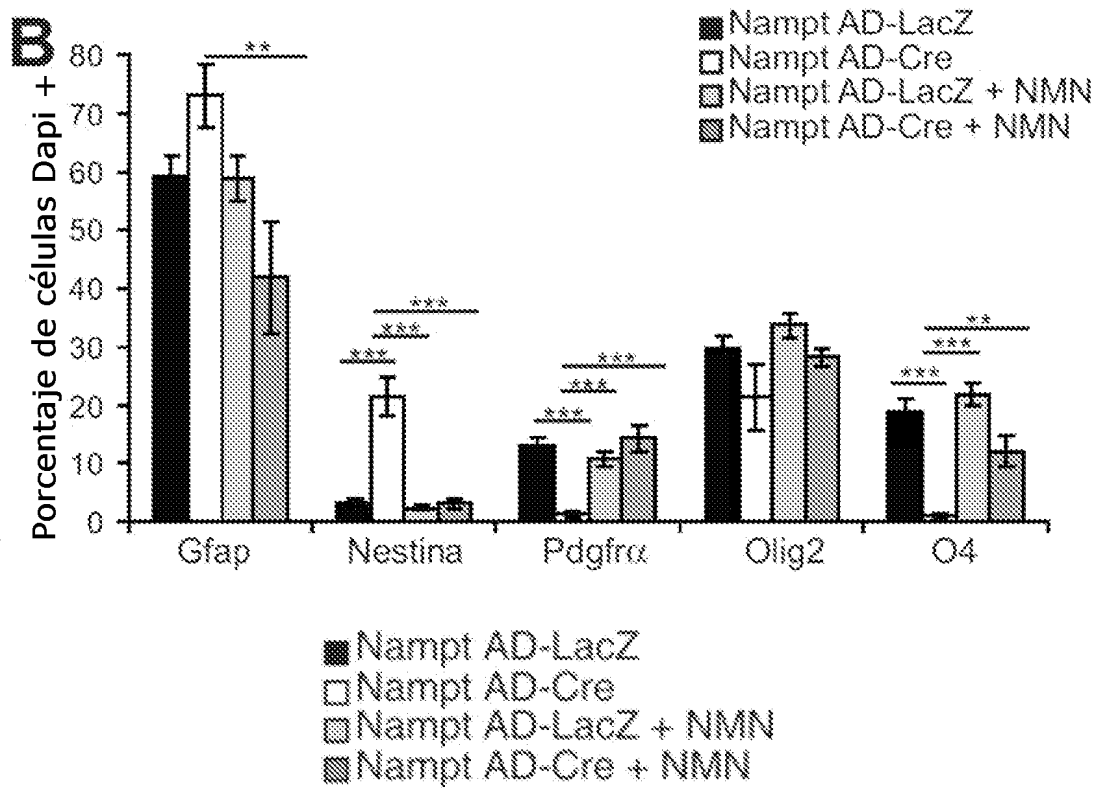


FIG. 19 D-E

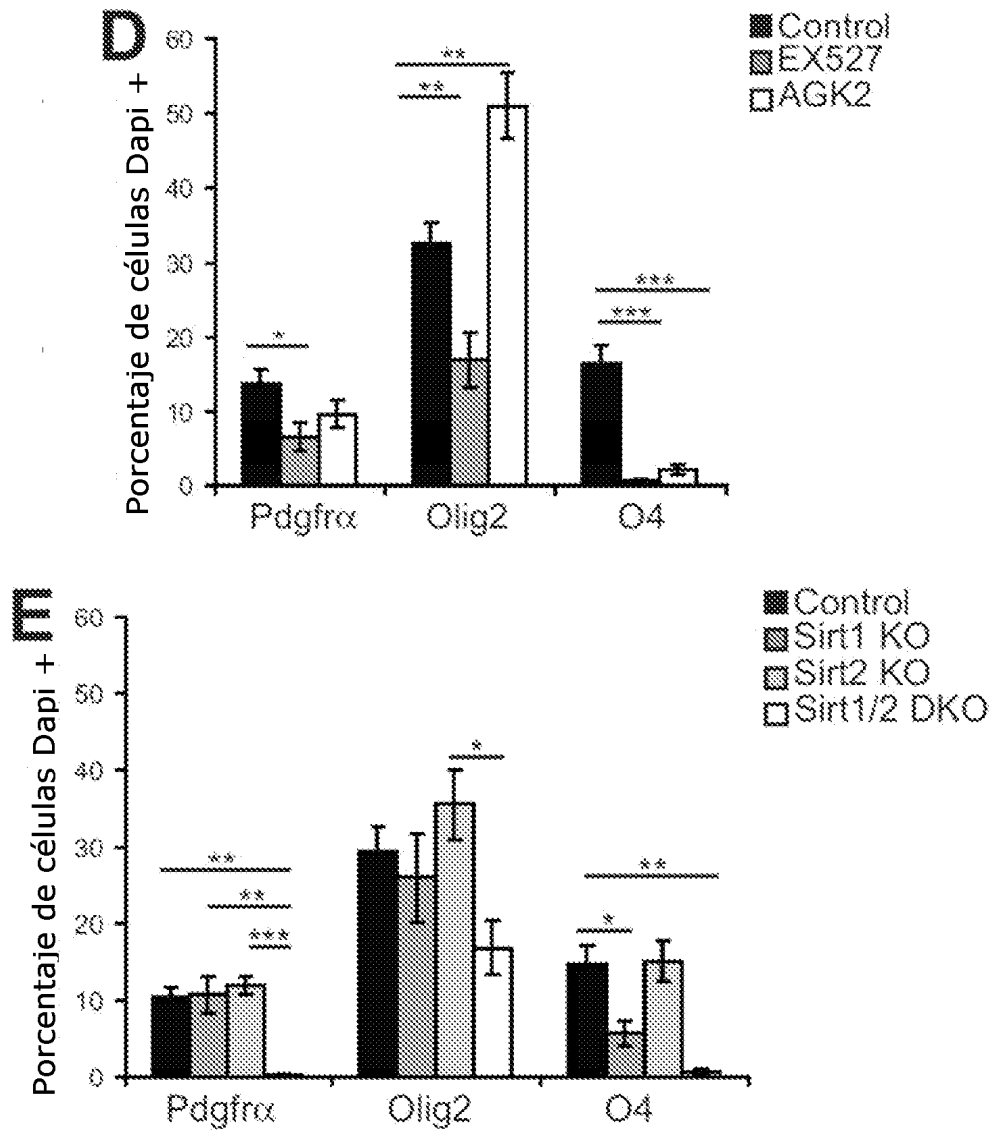


FIG. 19 F-G

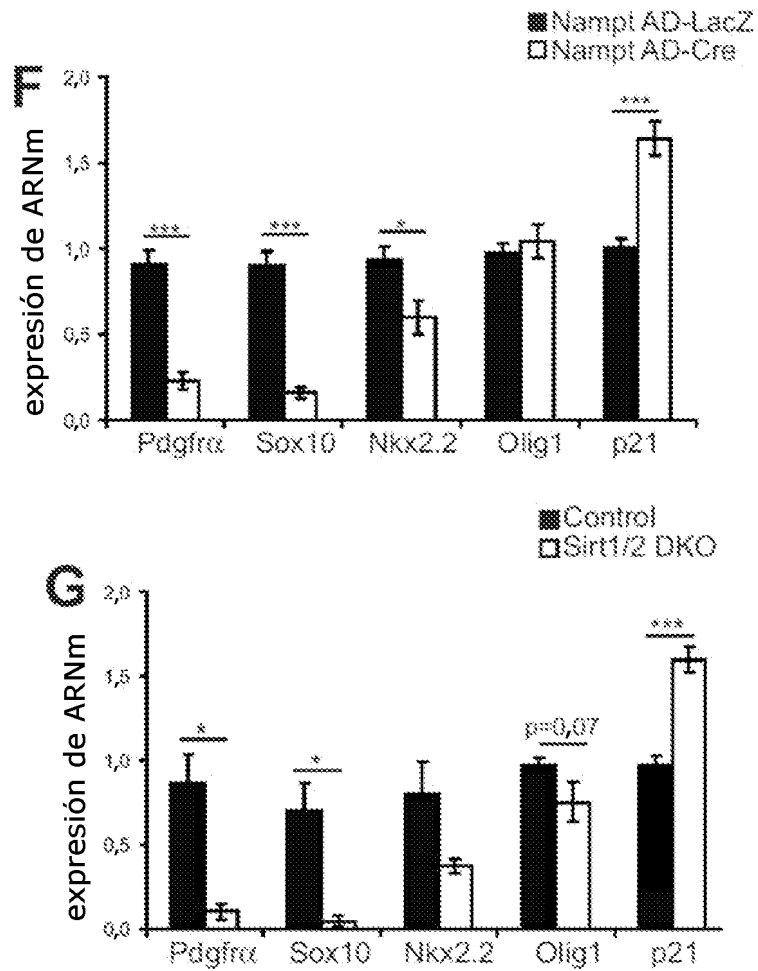
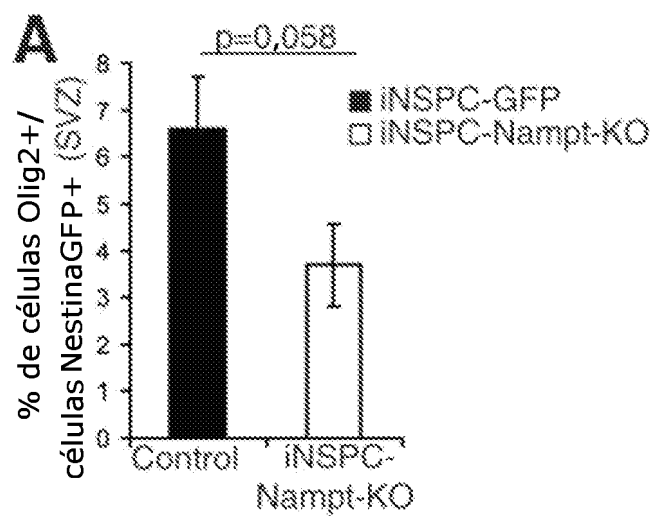
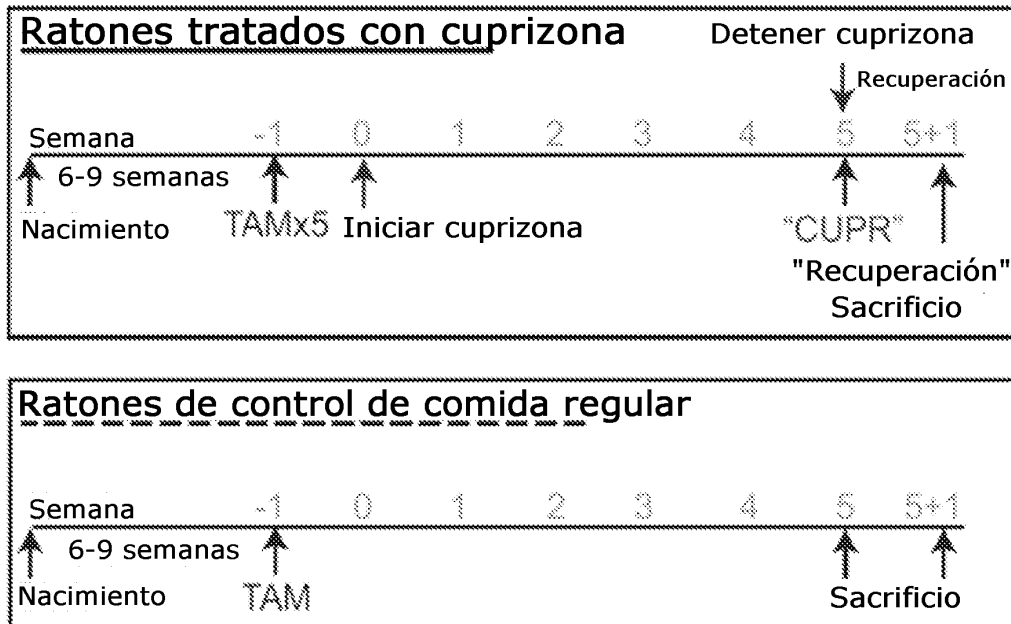


FIG. 20 A



B

FIG. 20B-C



C

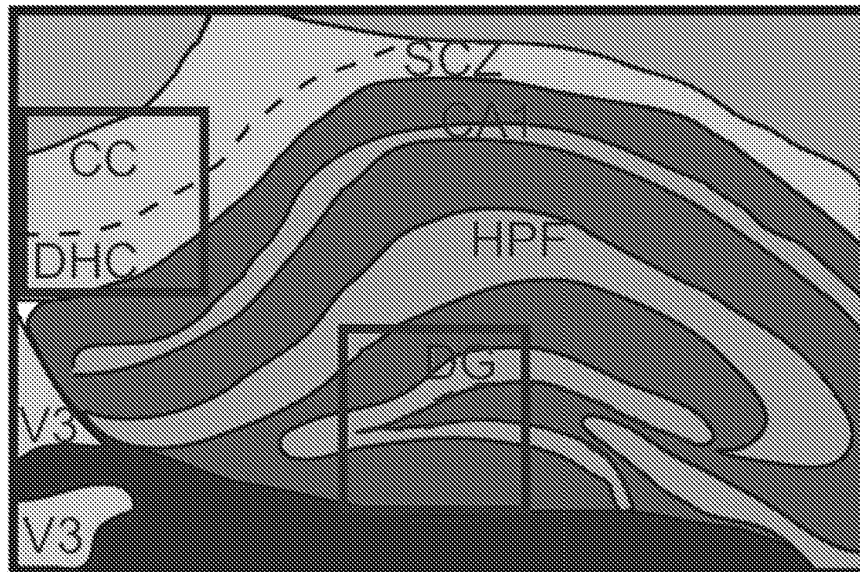
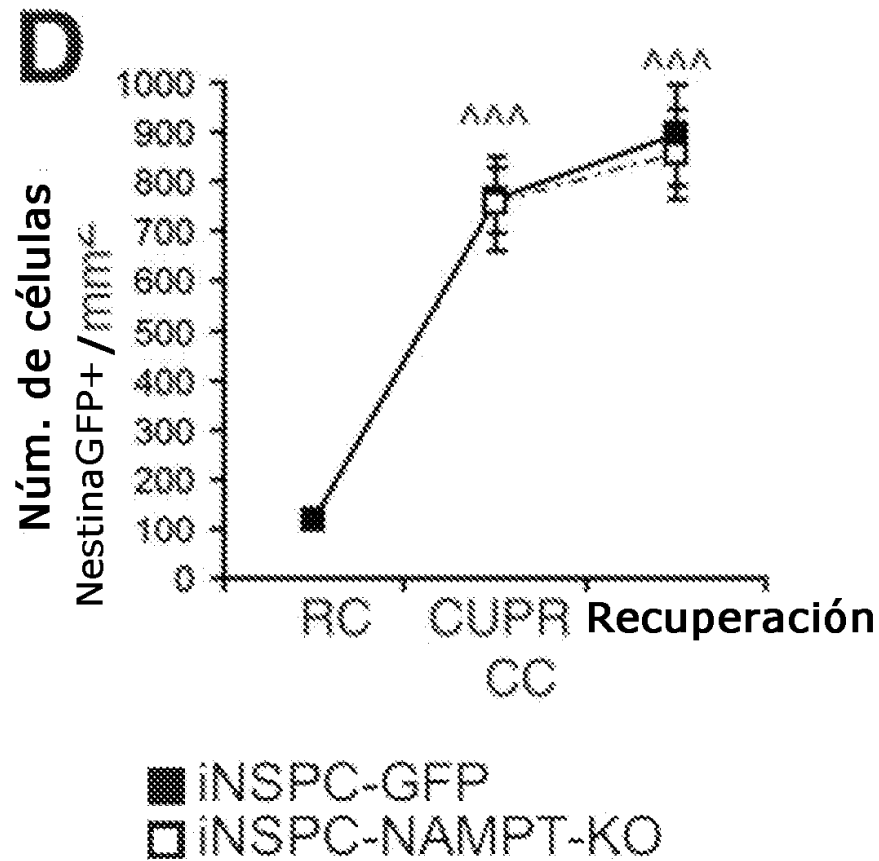


FIG. 20 D-E



E NSPC:
Células madre neurales tipo 1
Células de amplificación transitorias tipo 2a

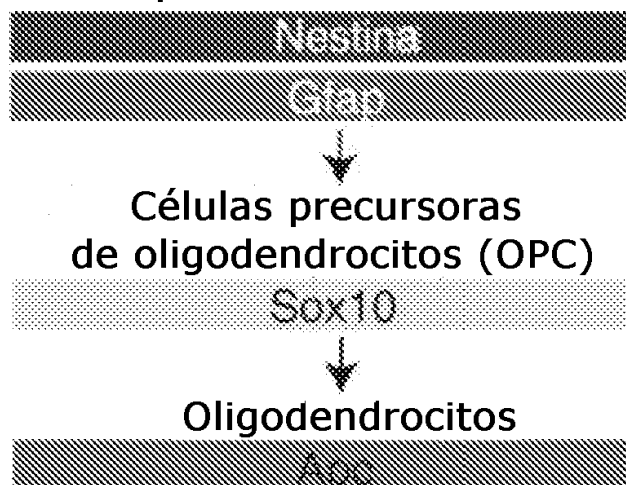
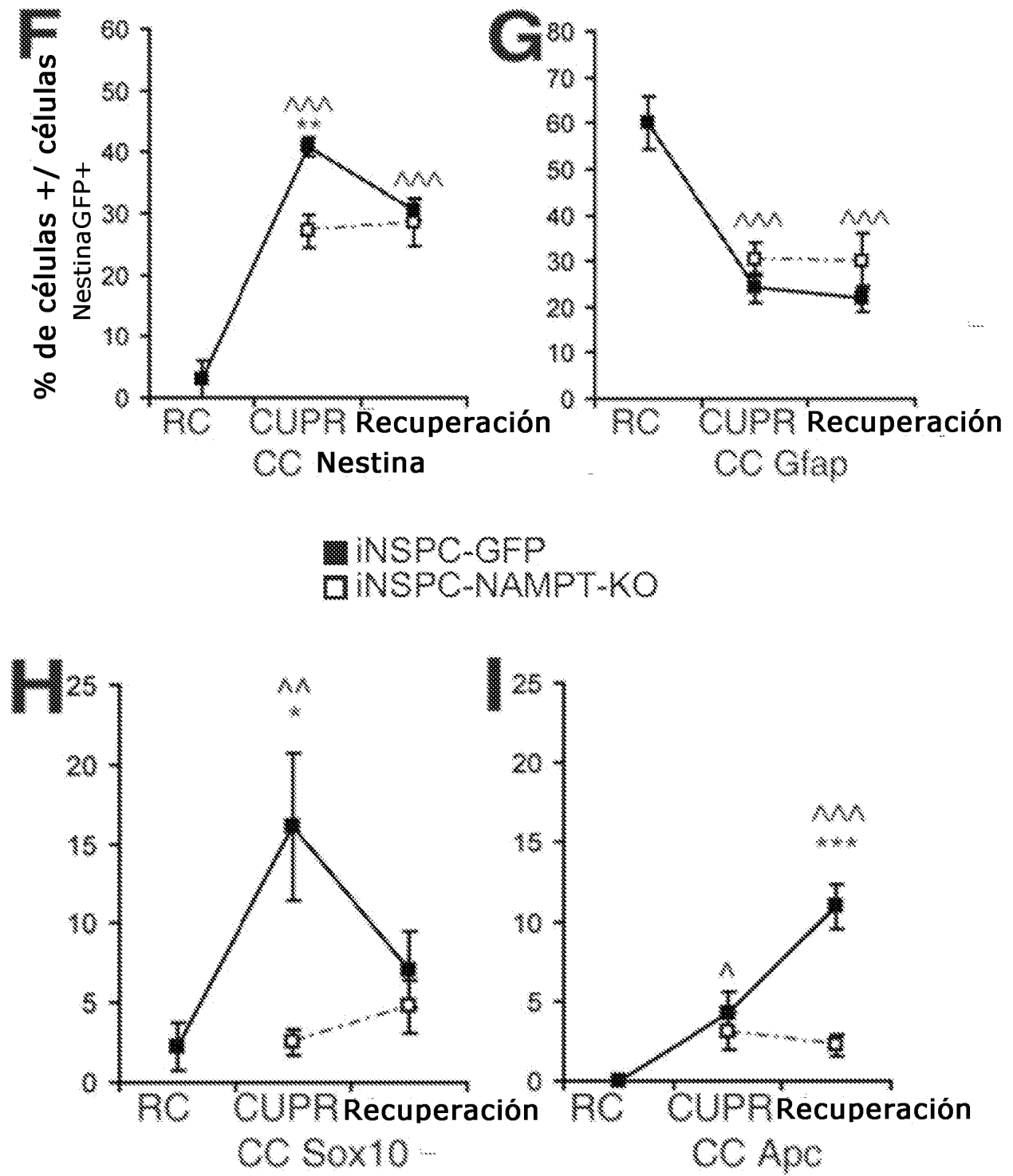


FIG. 20 F-I



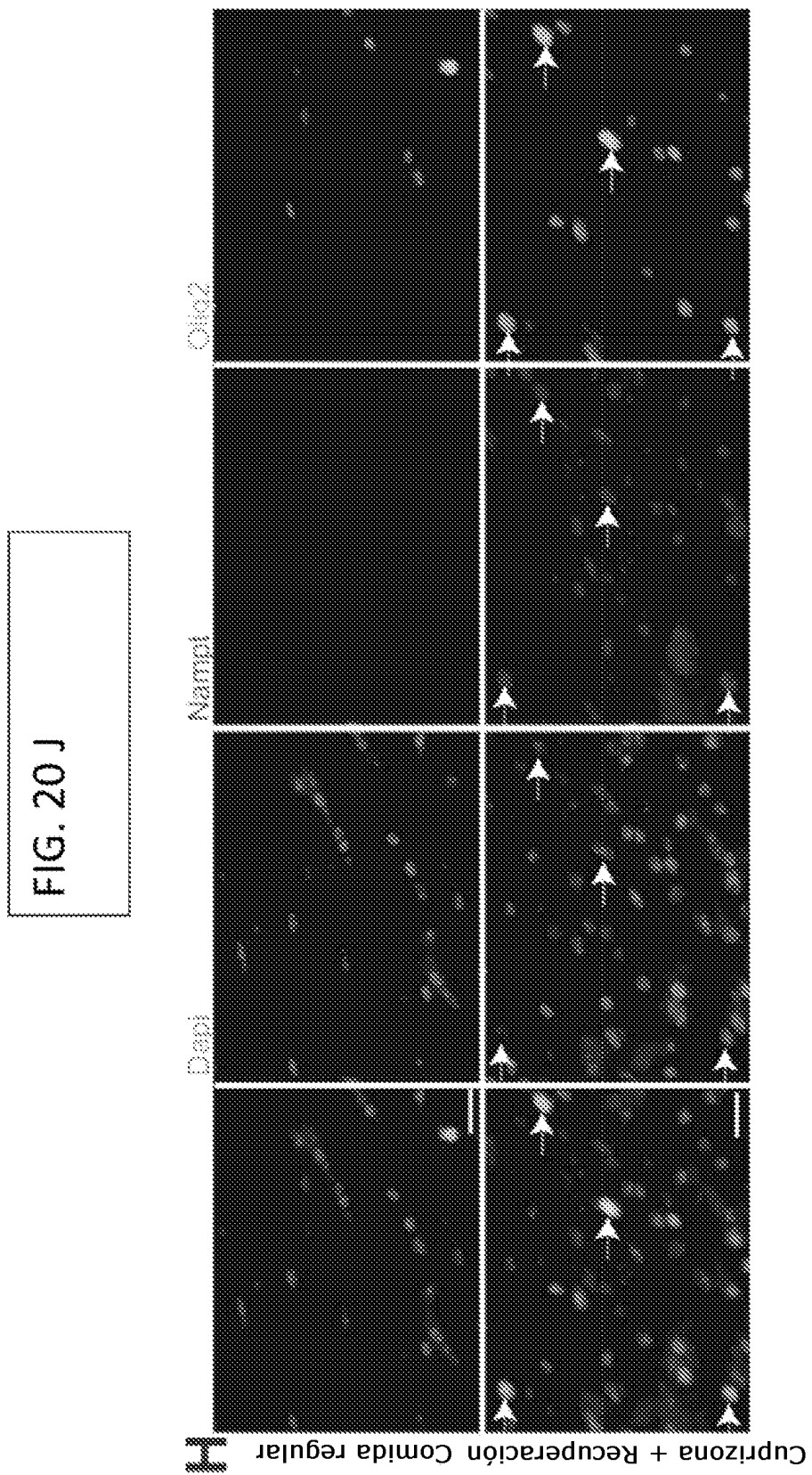


FIG. 21

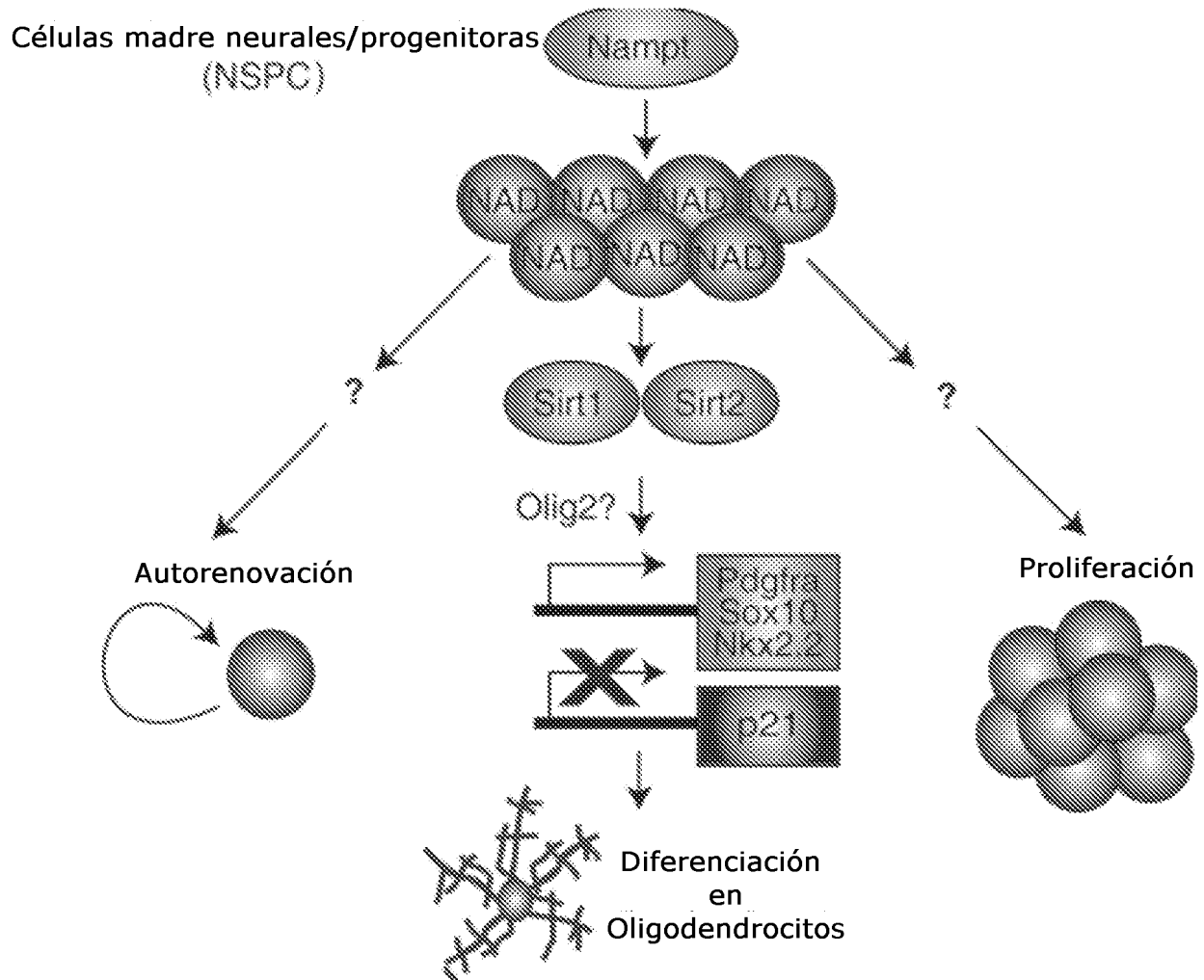


FIG. 22 A-C

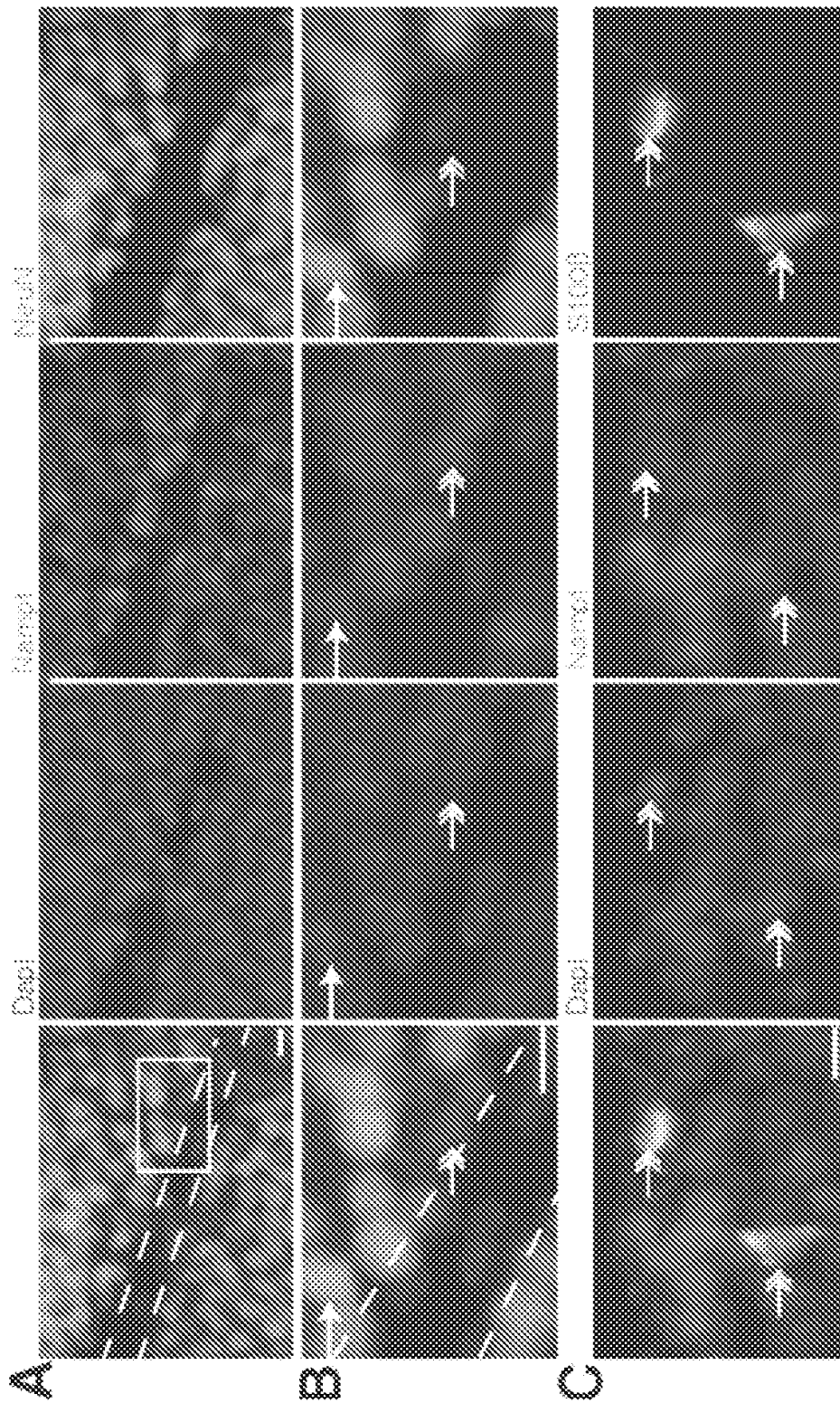


FIG. 22 D-G

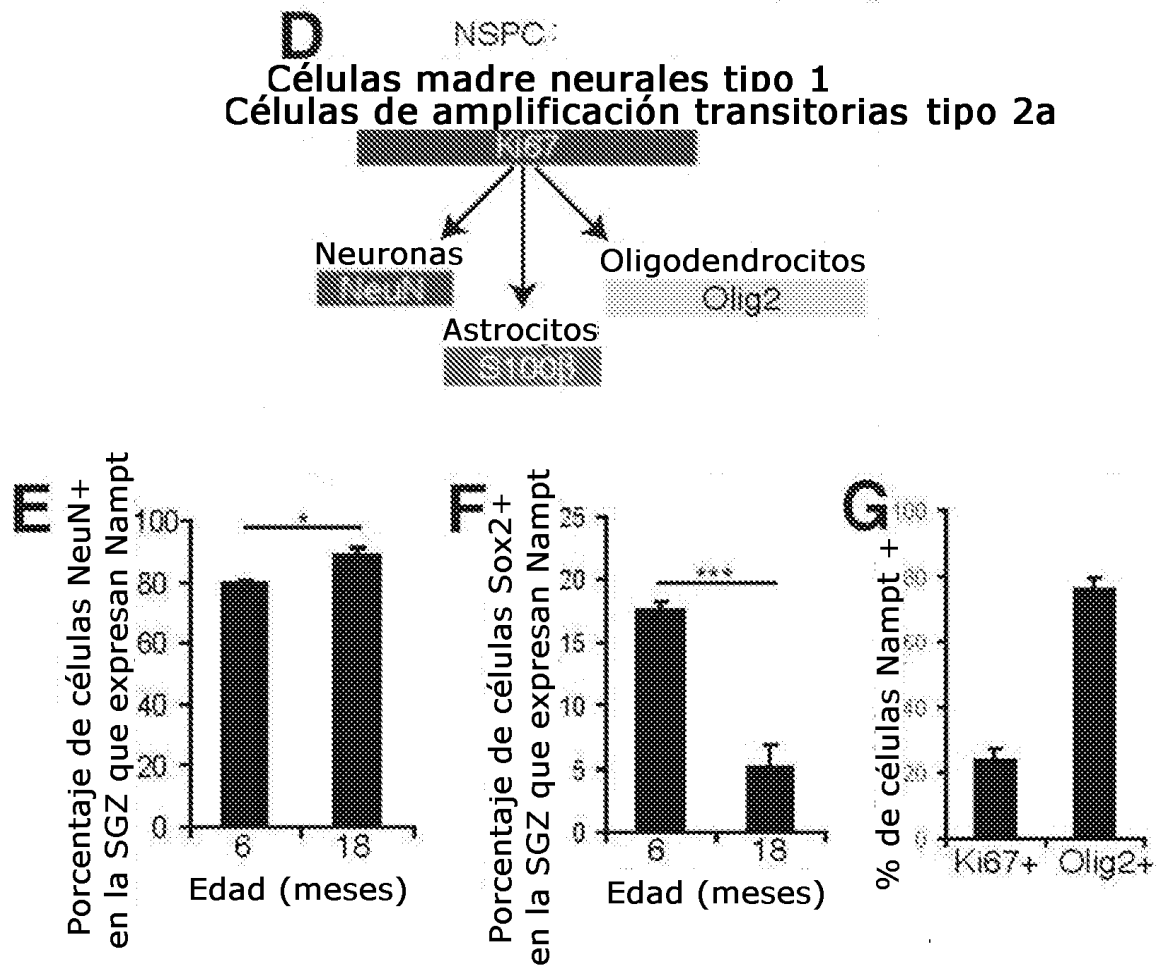


FIG. 22 H-I

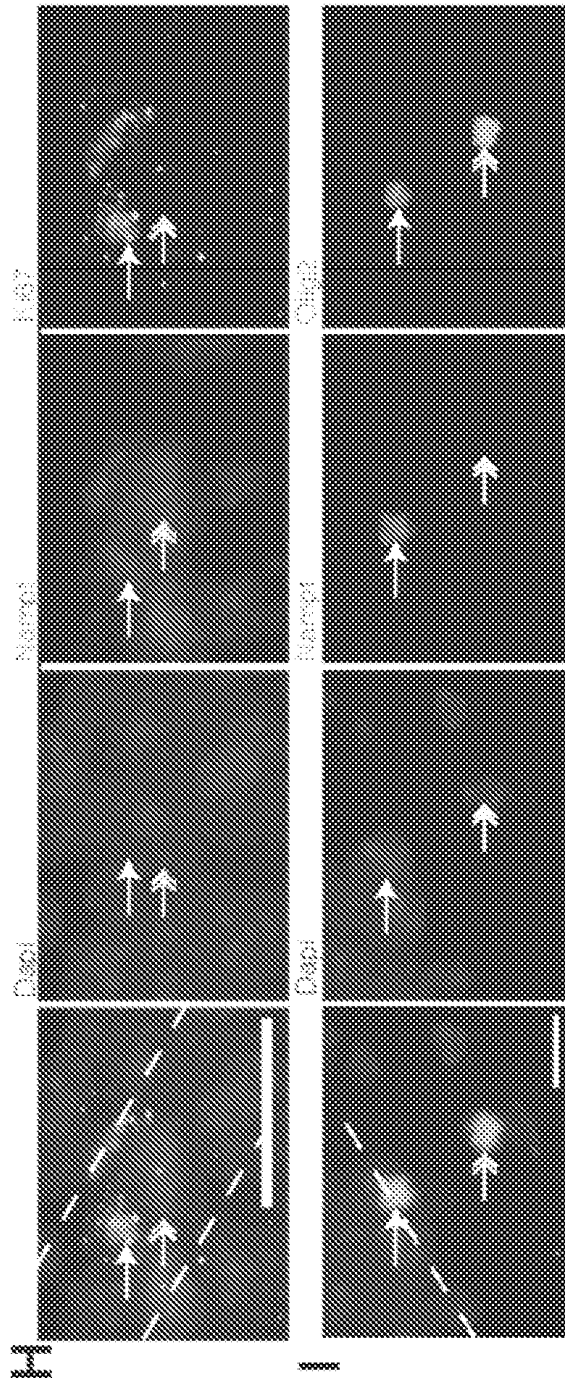


FIG. 23 A-B

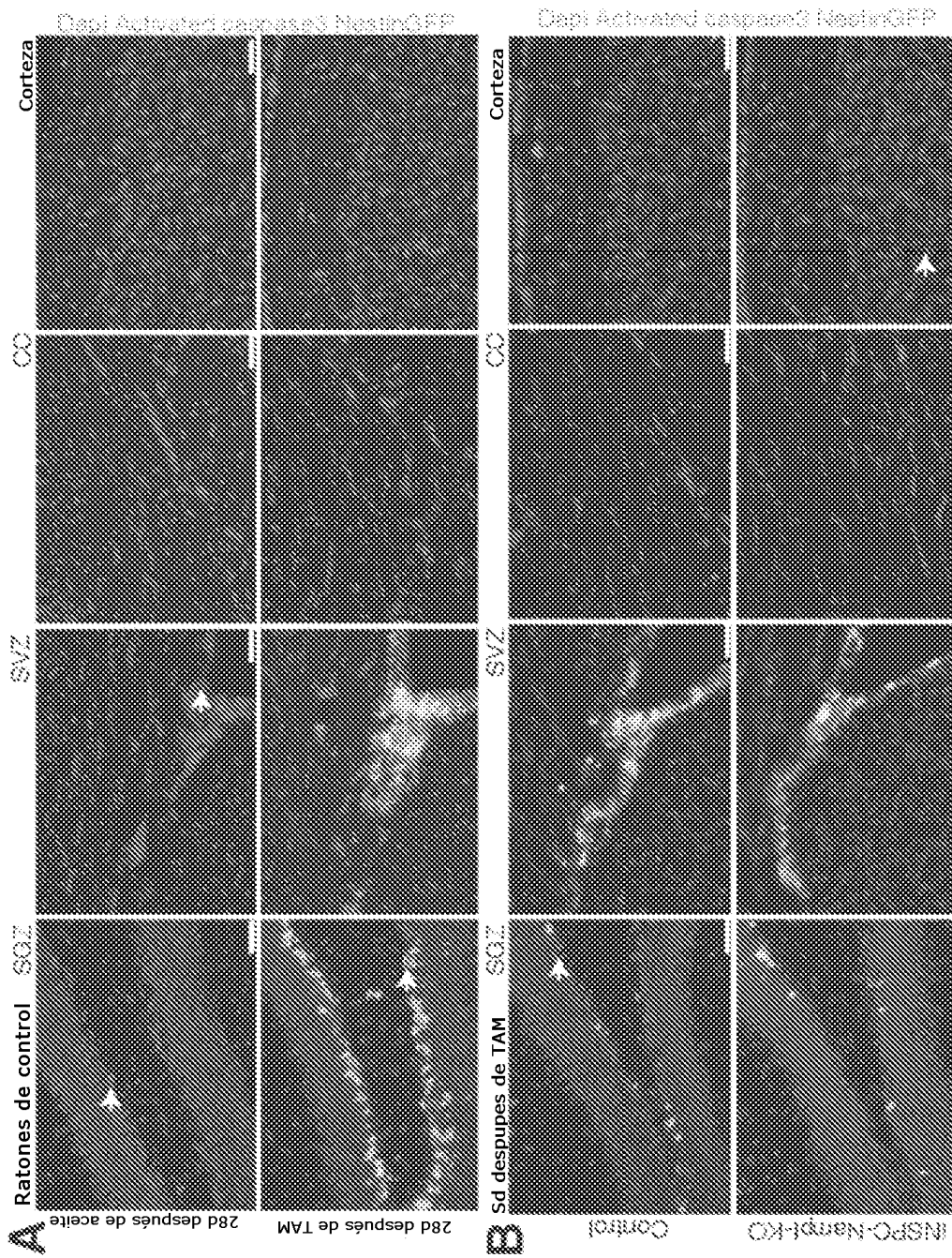


FIG. 23 C-I

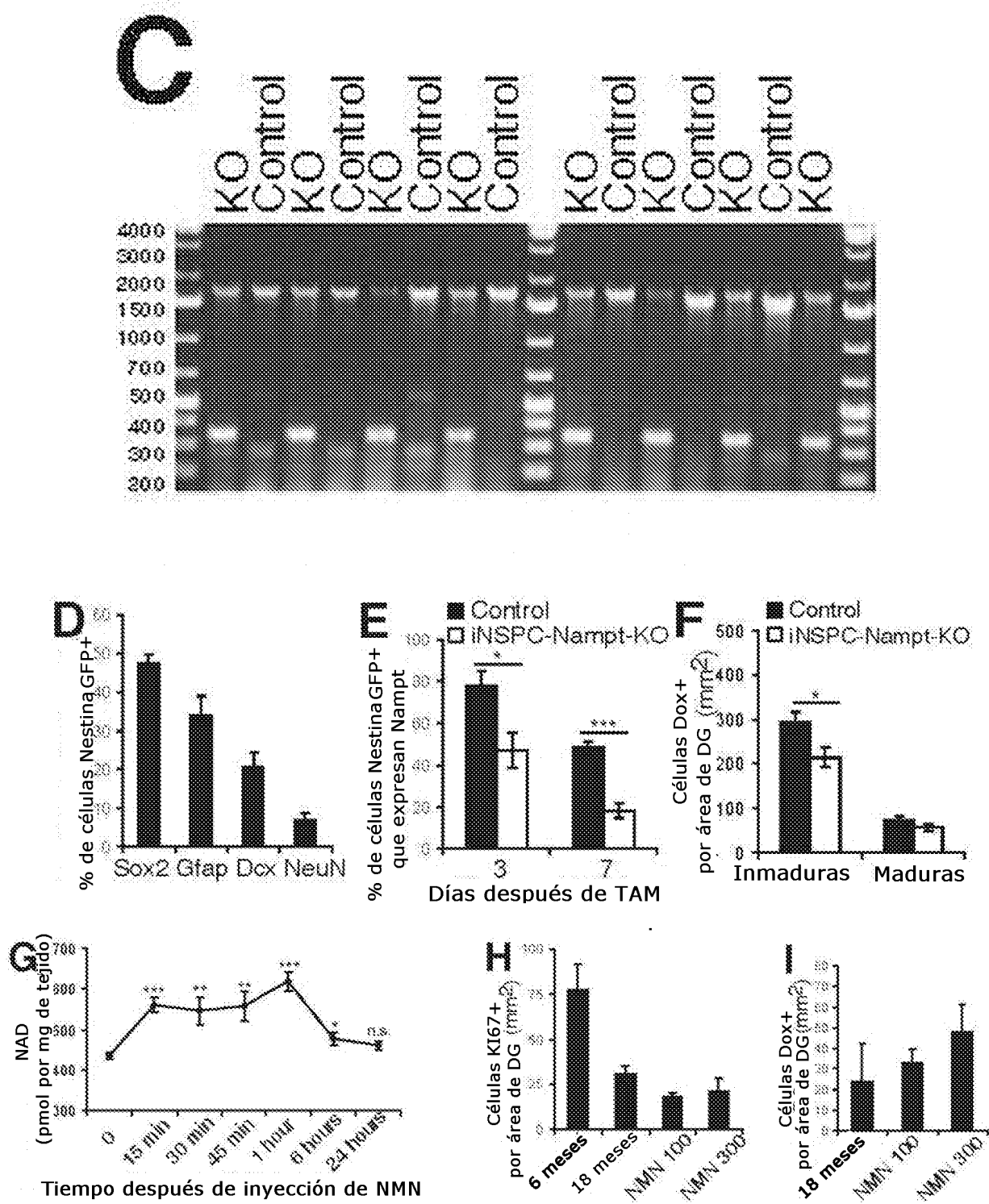


FIG. 24 A-E

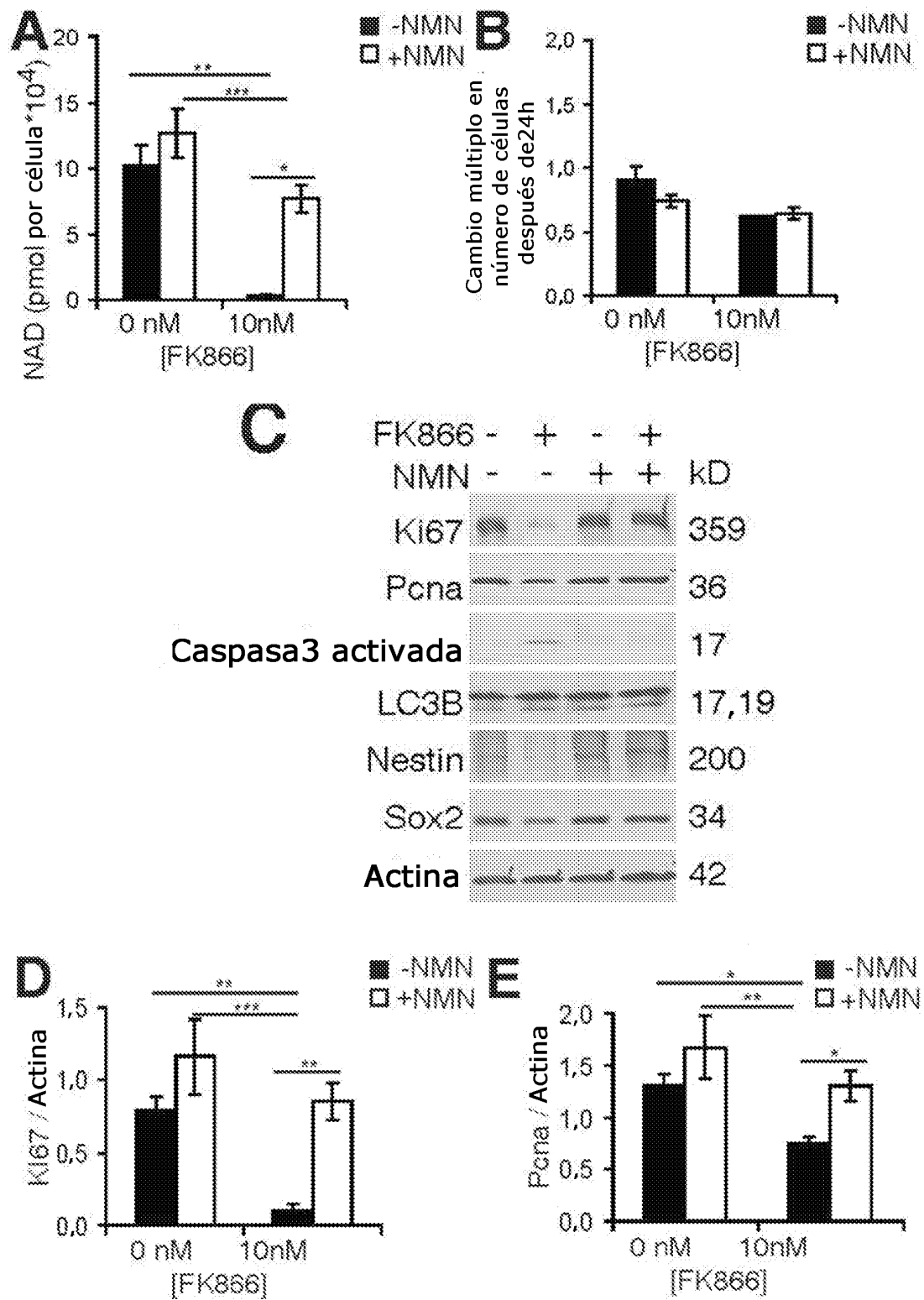


FIG. 25 A-D

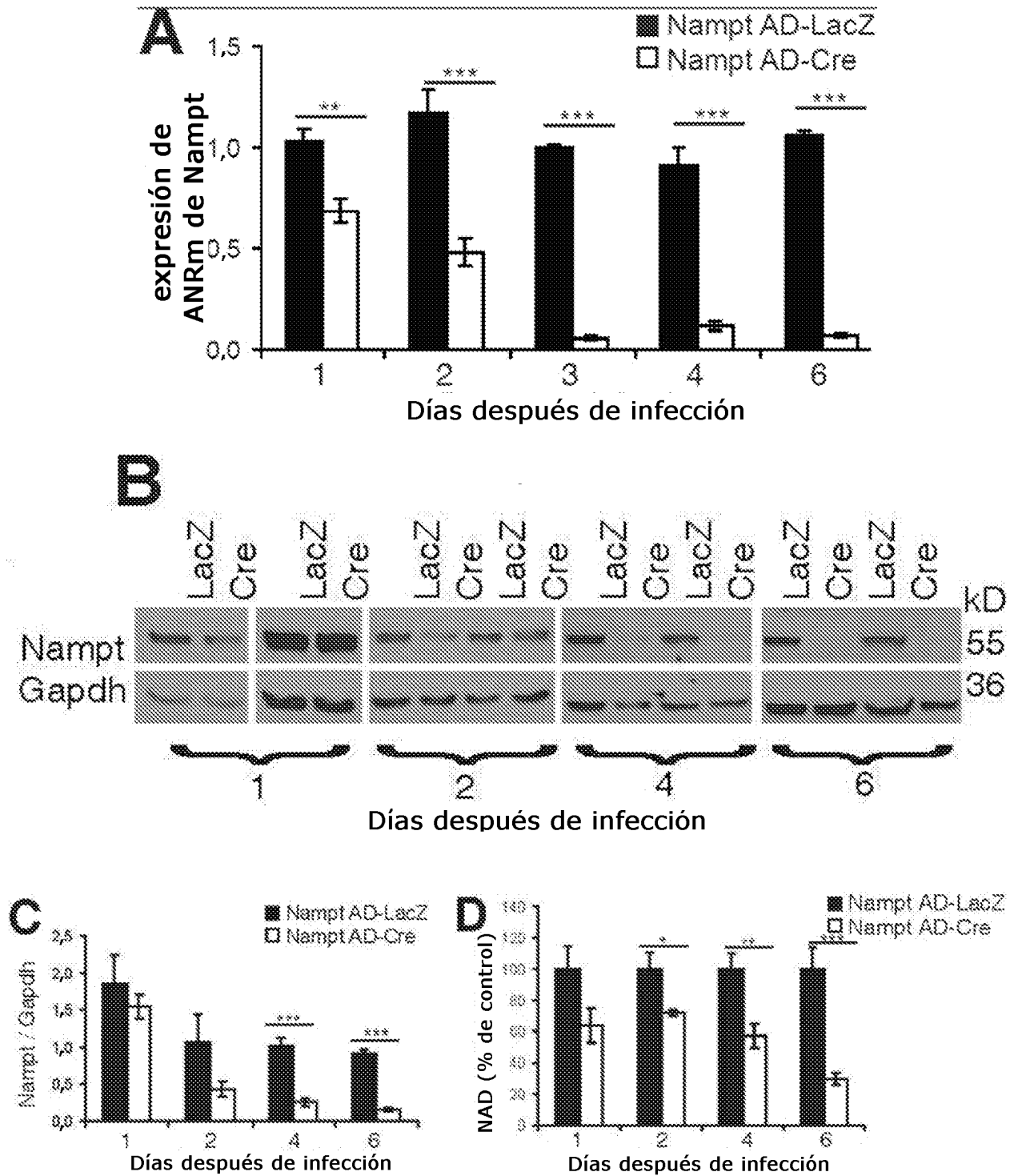


FIG. 25 E-G

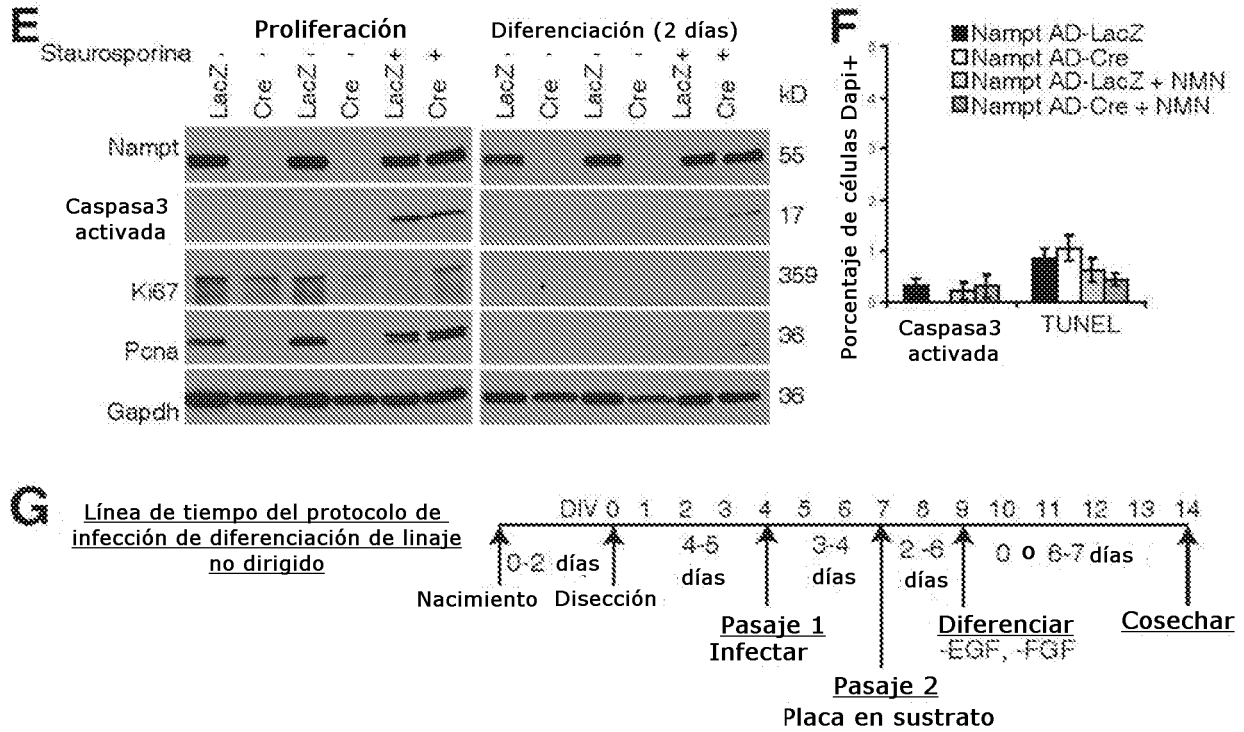


FIG. 26 A-D

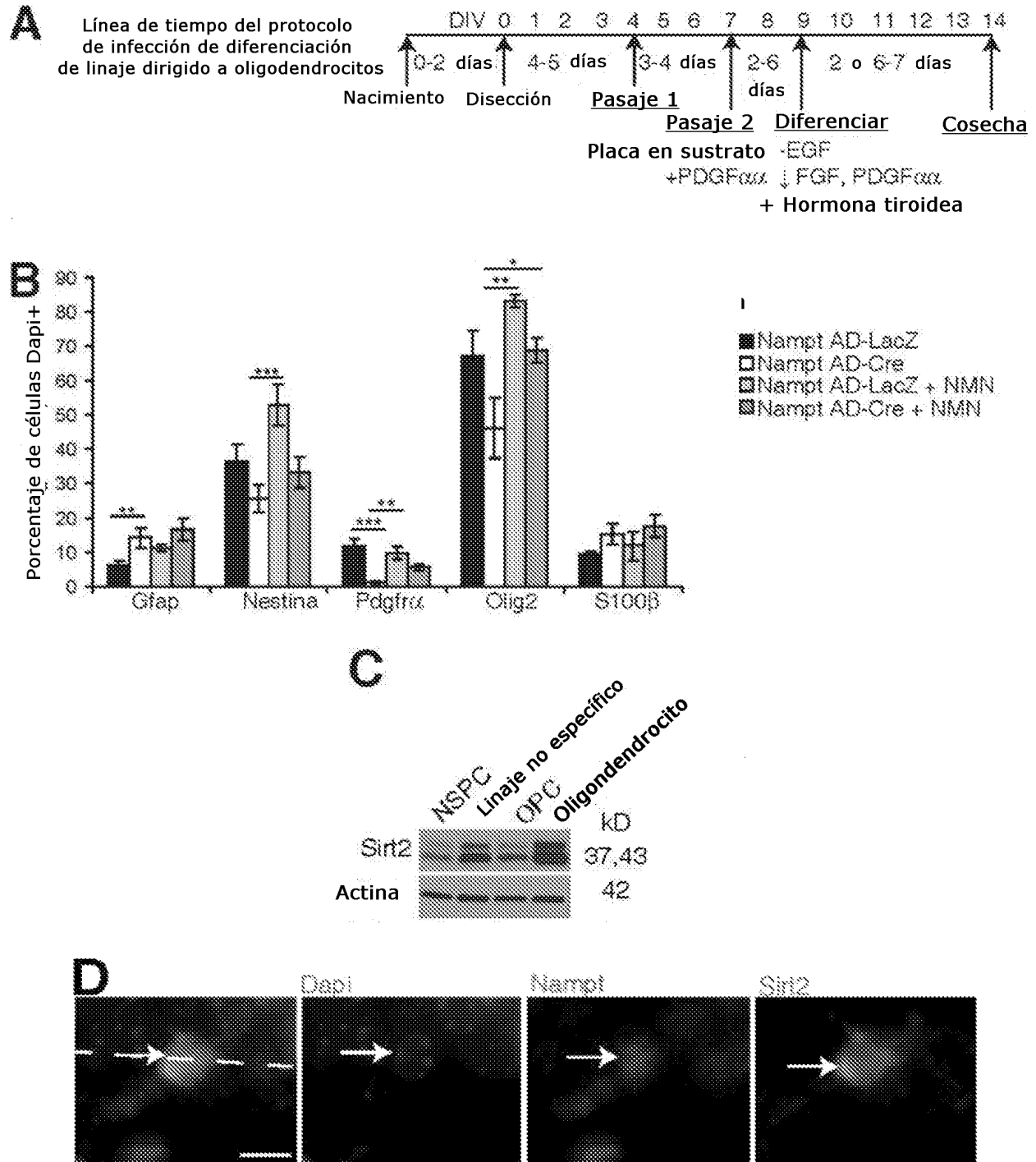


FIG. 26 E-J

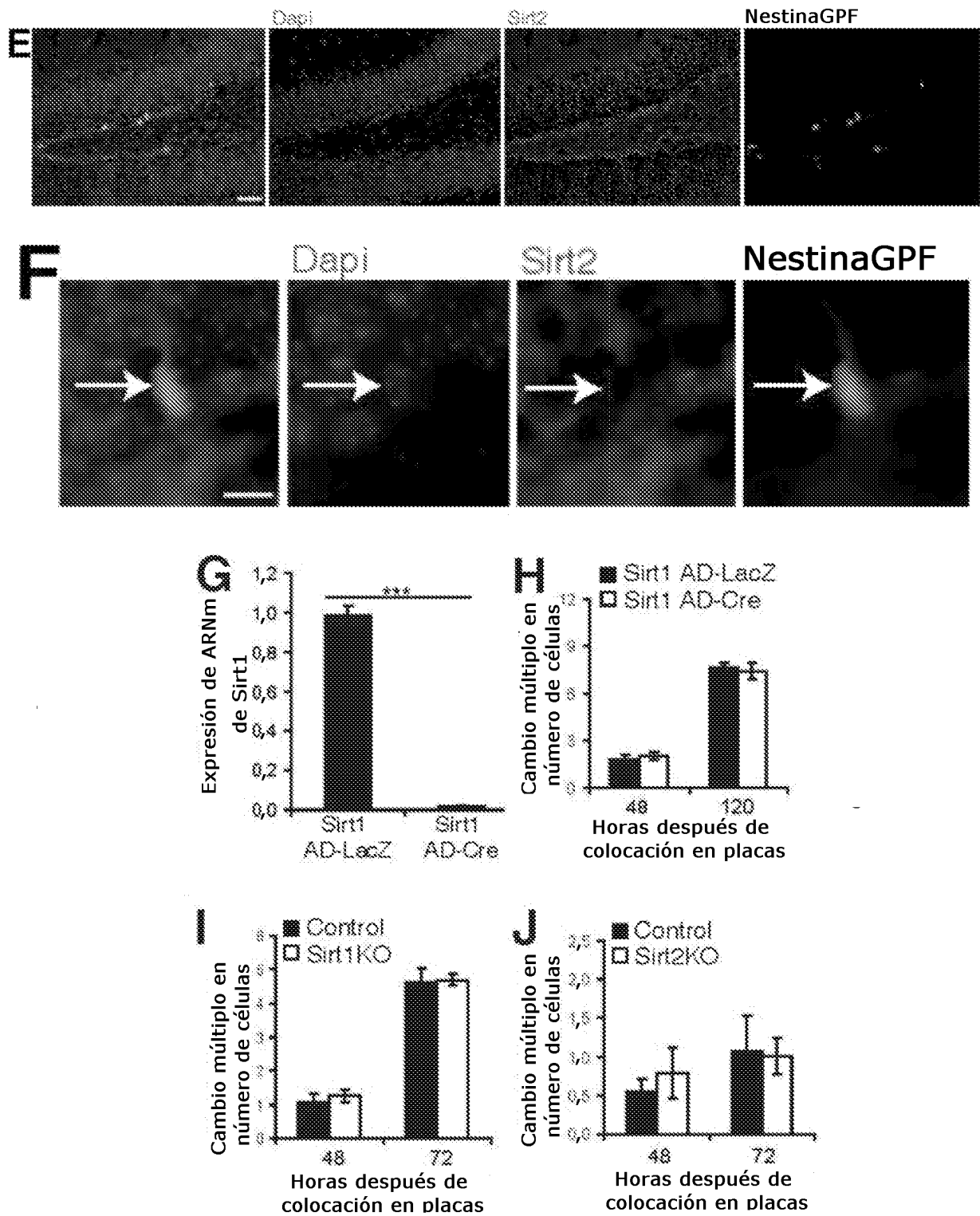


FIG. 27 A-C

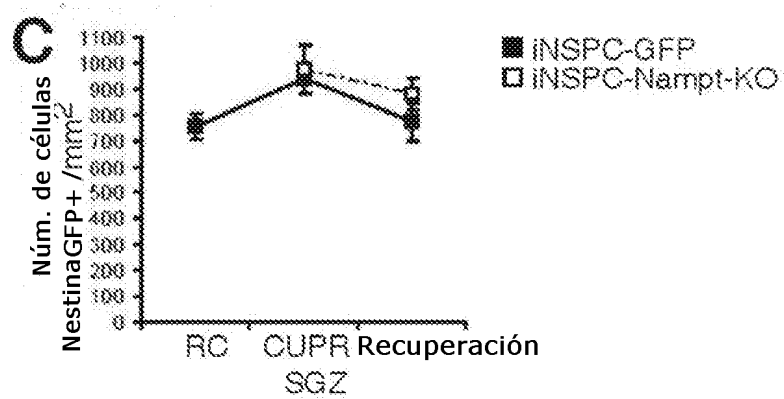
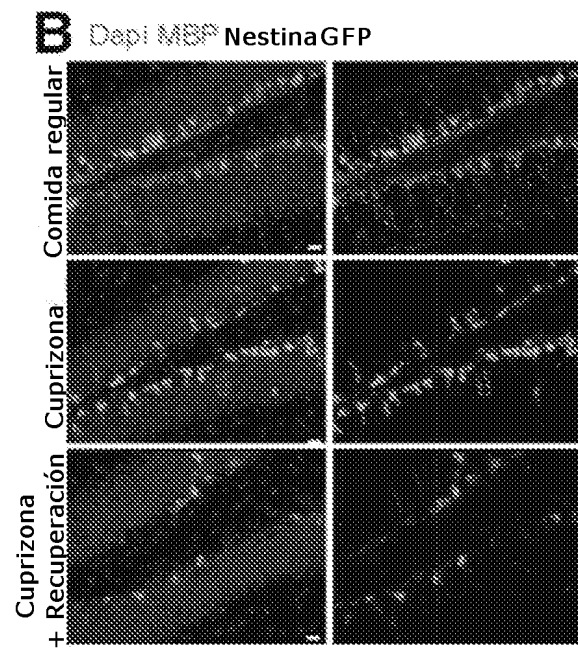
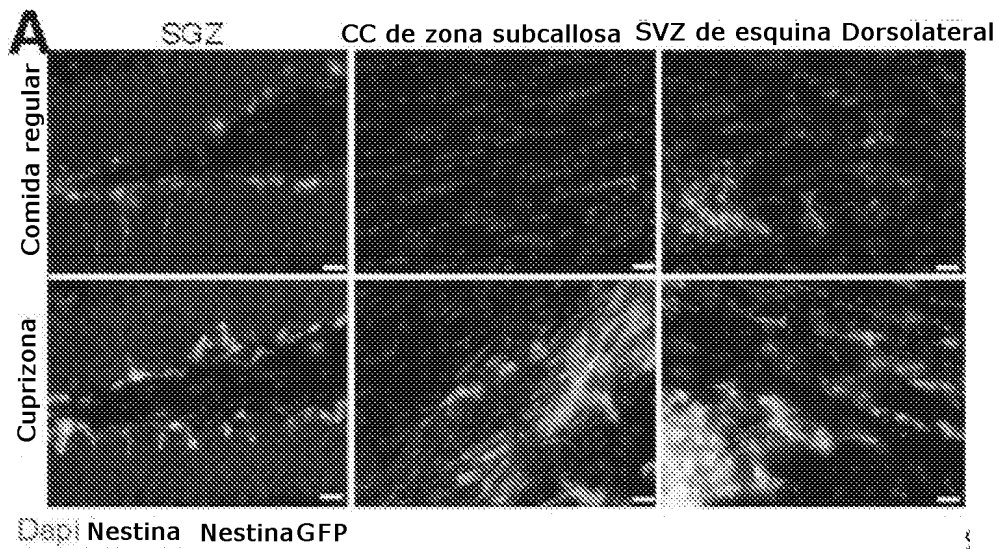


FIG. 27 D-H

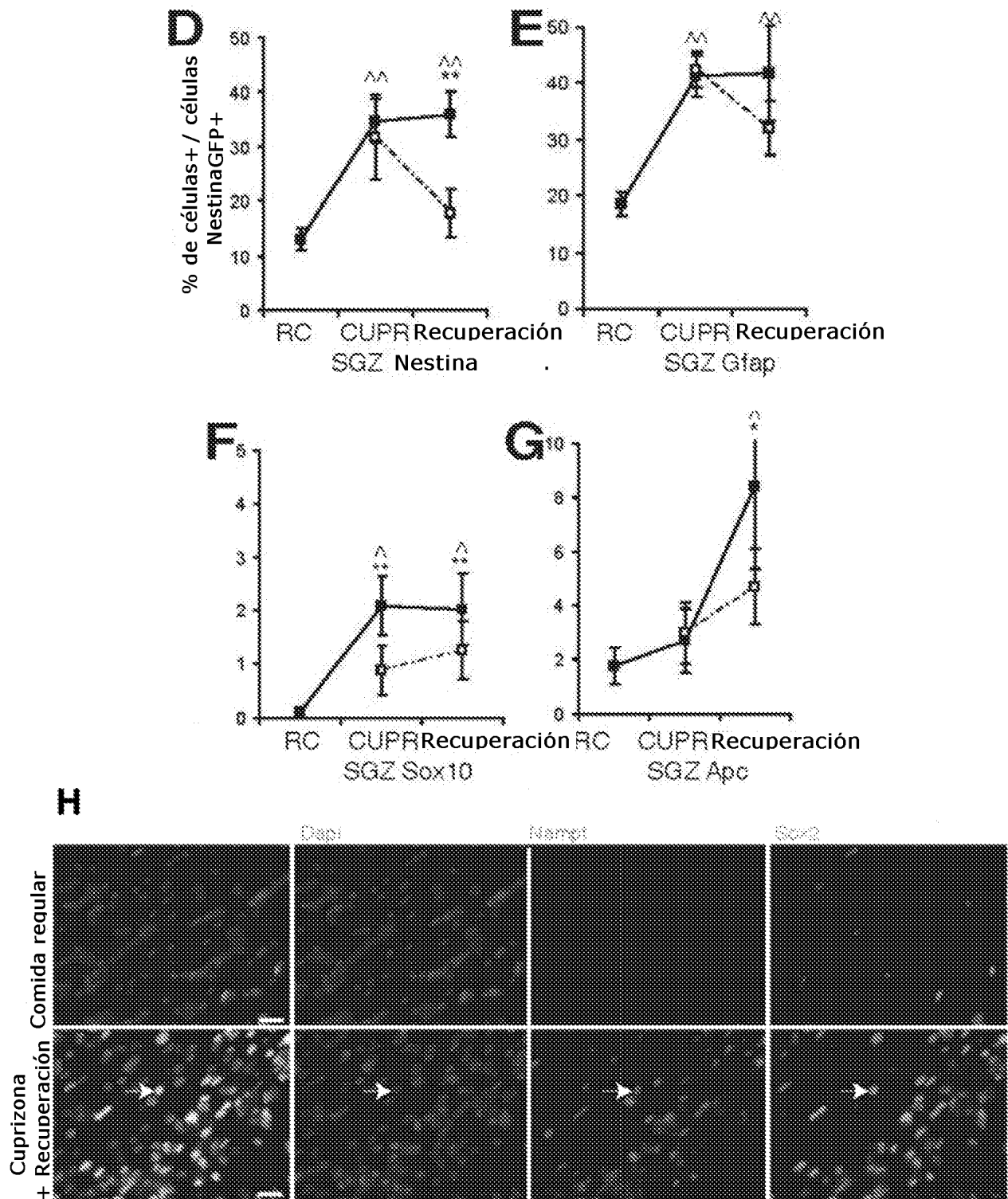
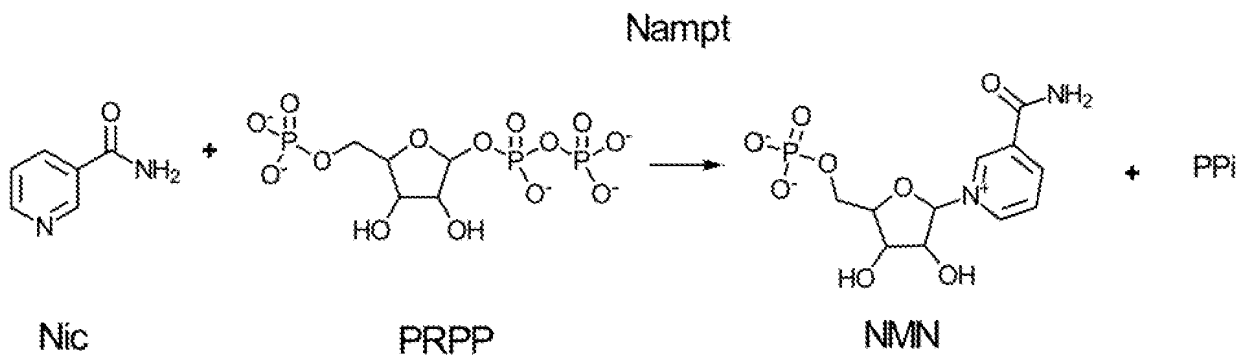


FIG. 28 A-B

A



B

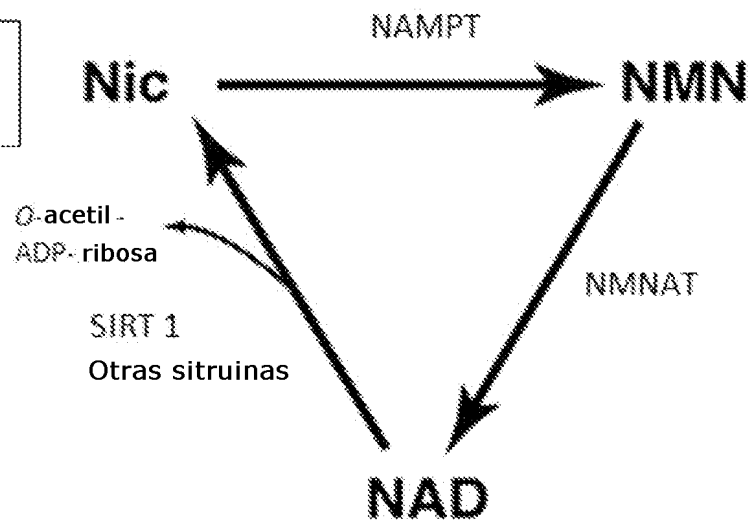


FIG. 30

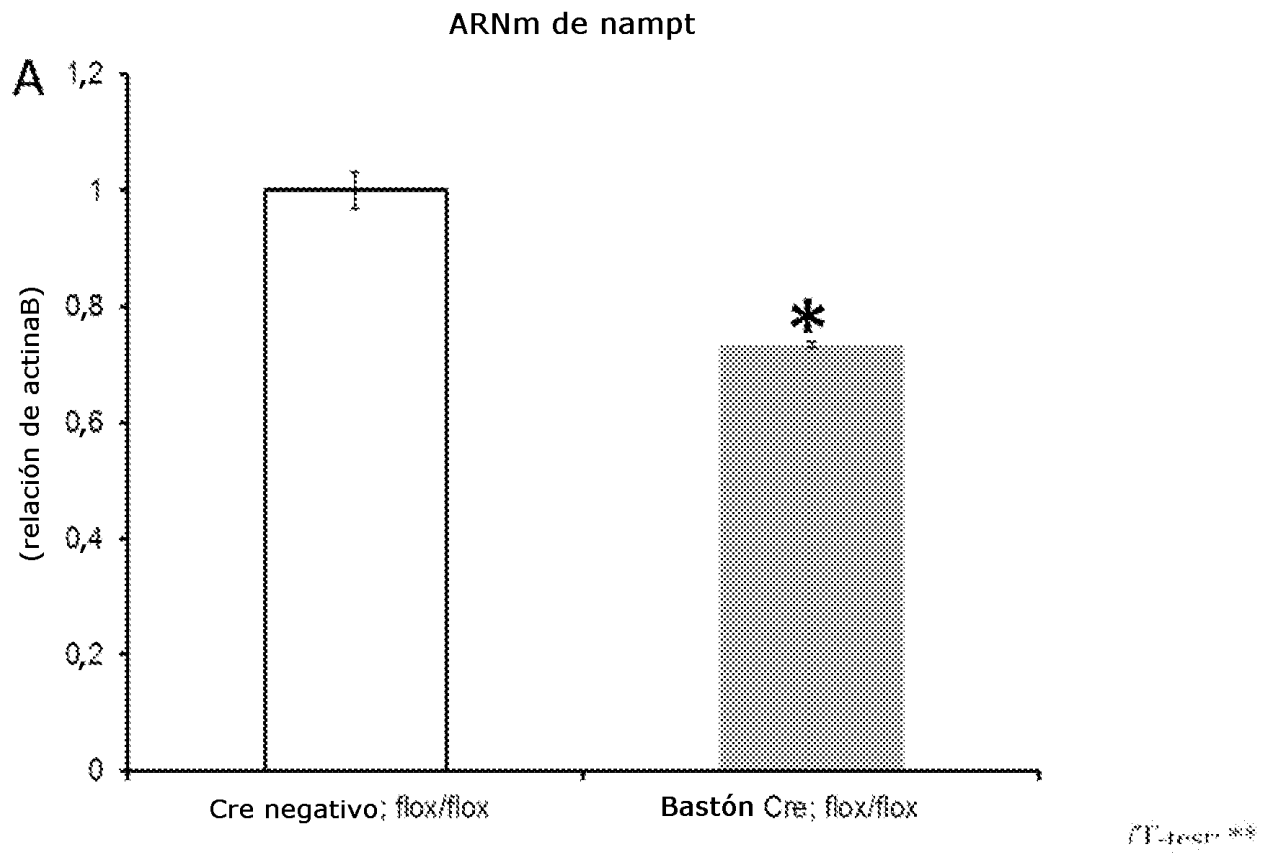


FIG. 30 B

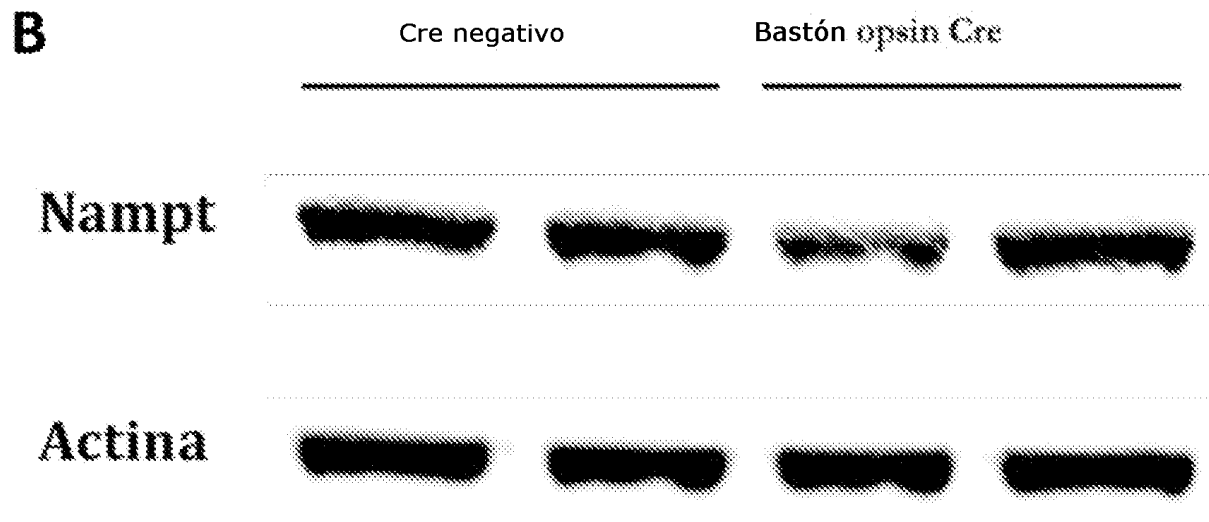


FIG. 30 C

C

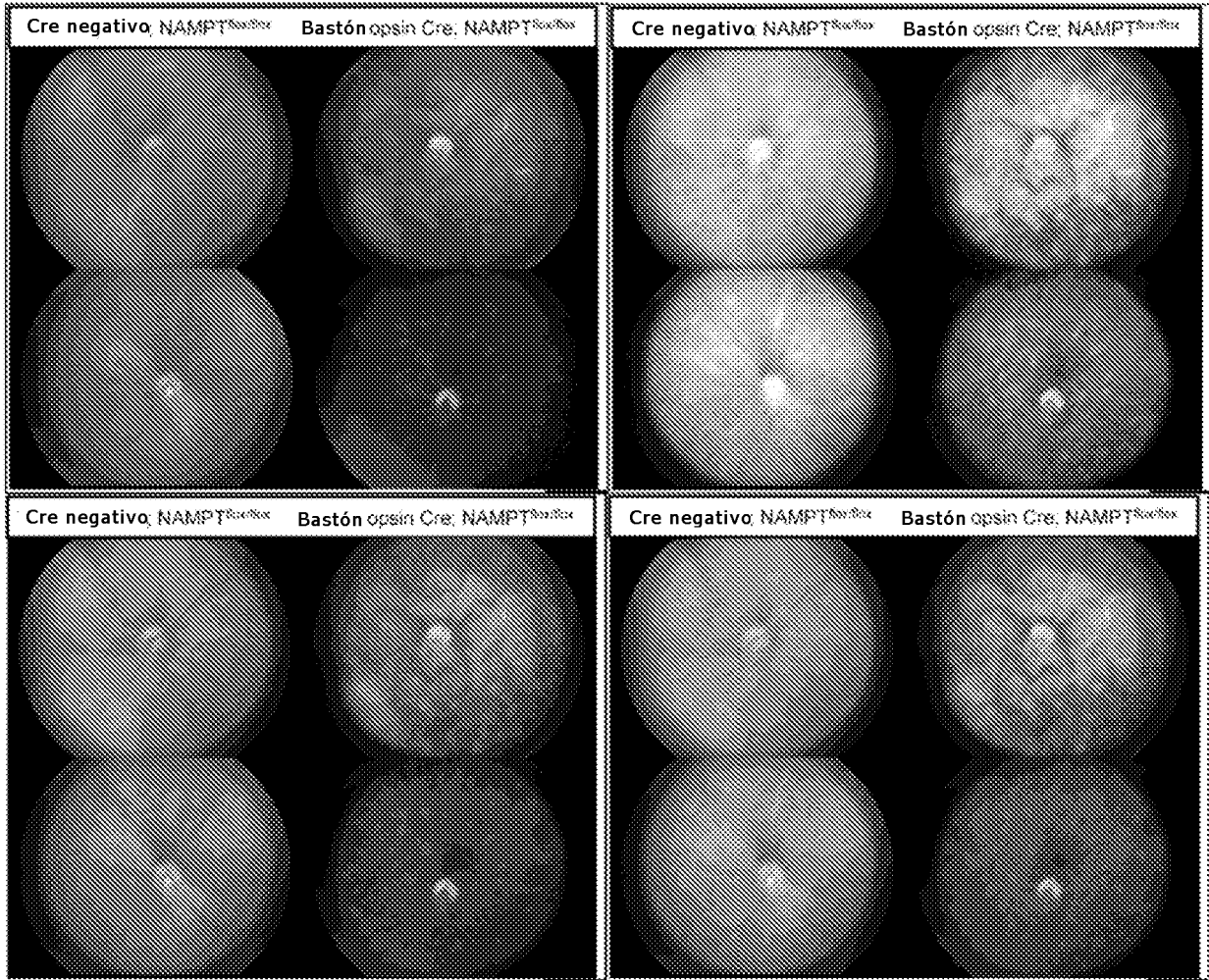
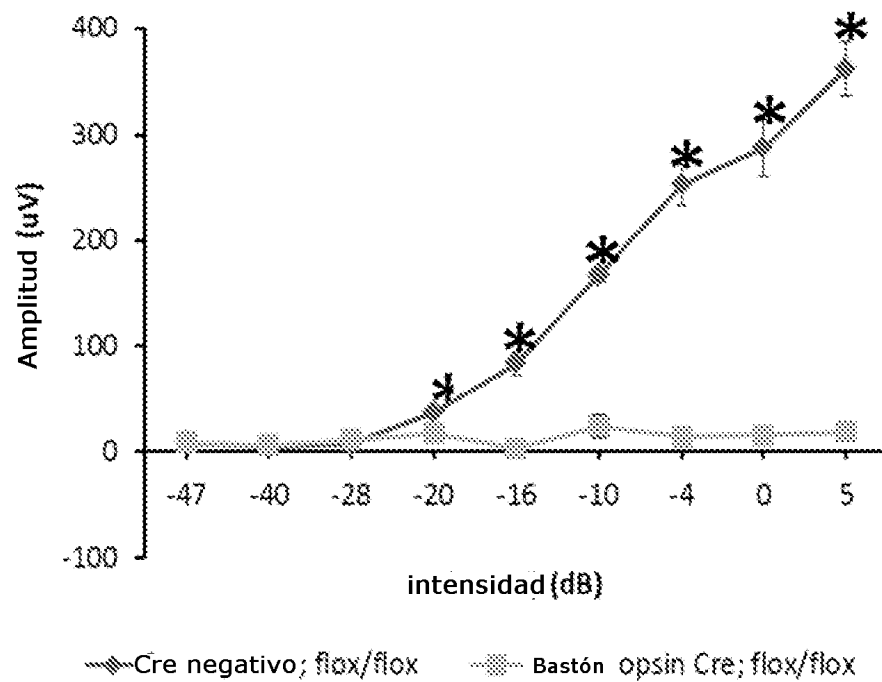


FIG. 30 D-E

D

Onda escotópica a



E

Onda escotópica b

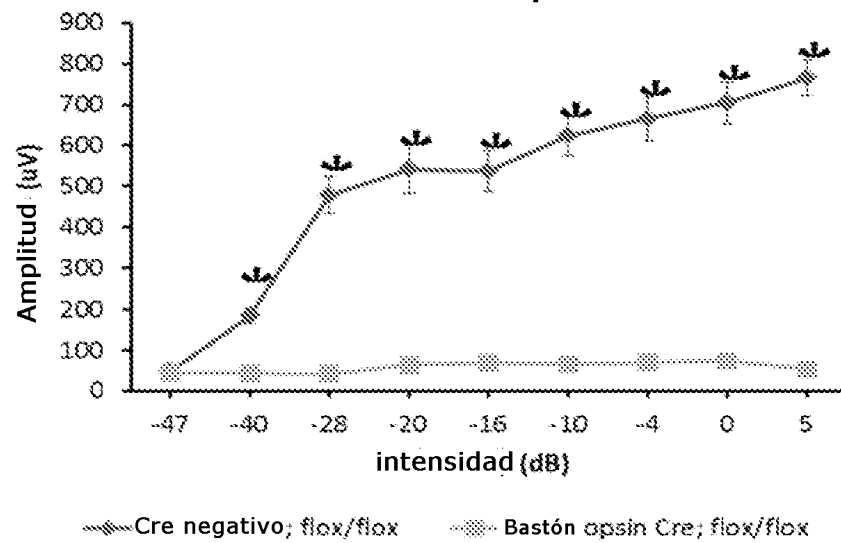
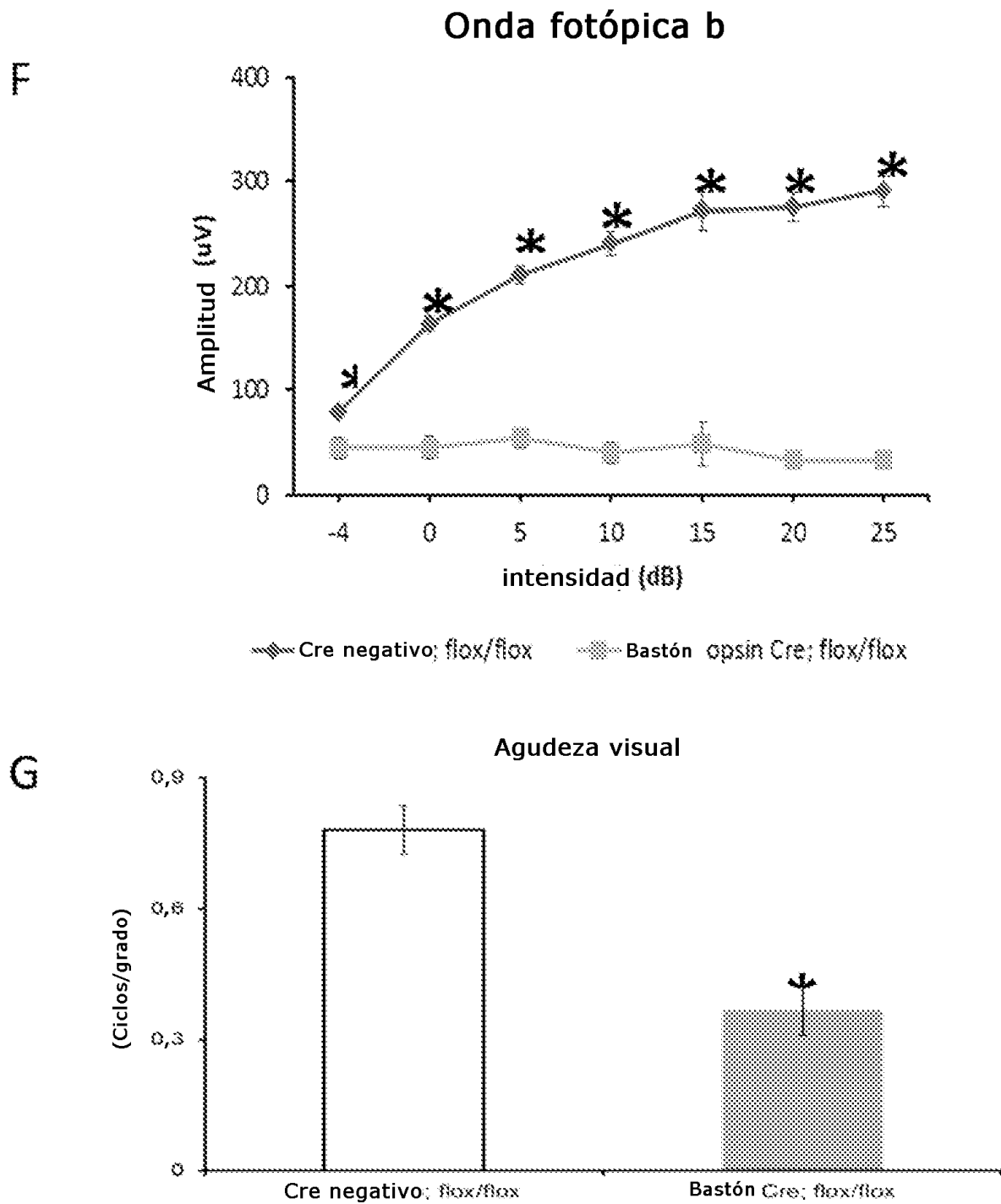


FIG. 30 F-G



H

FIG. 1 H

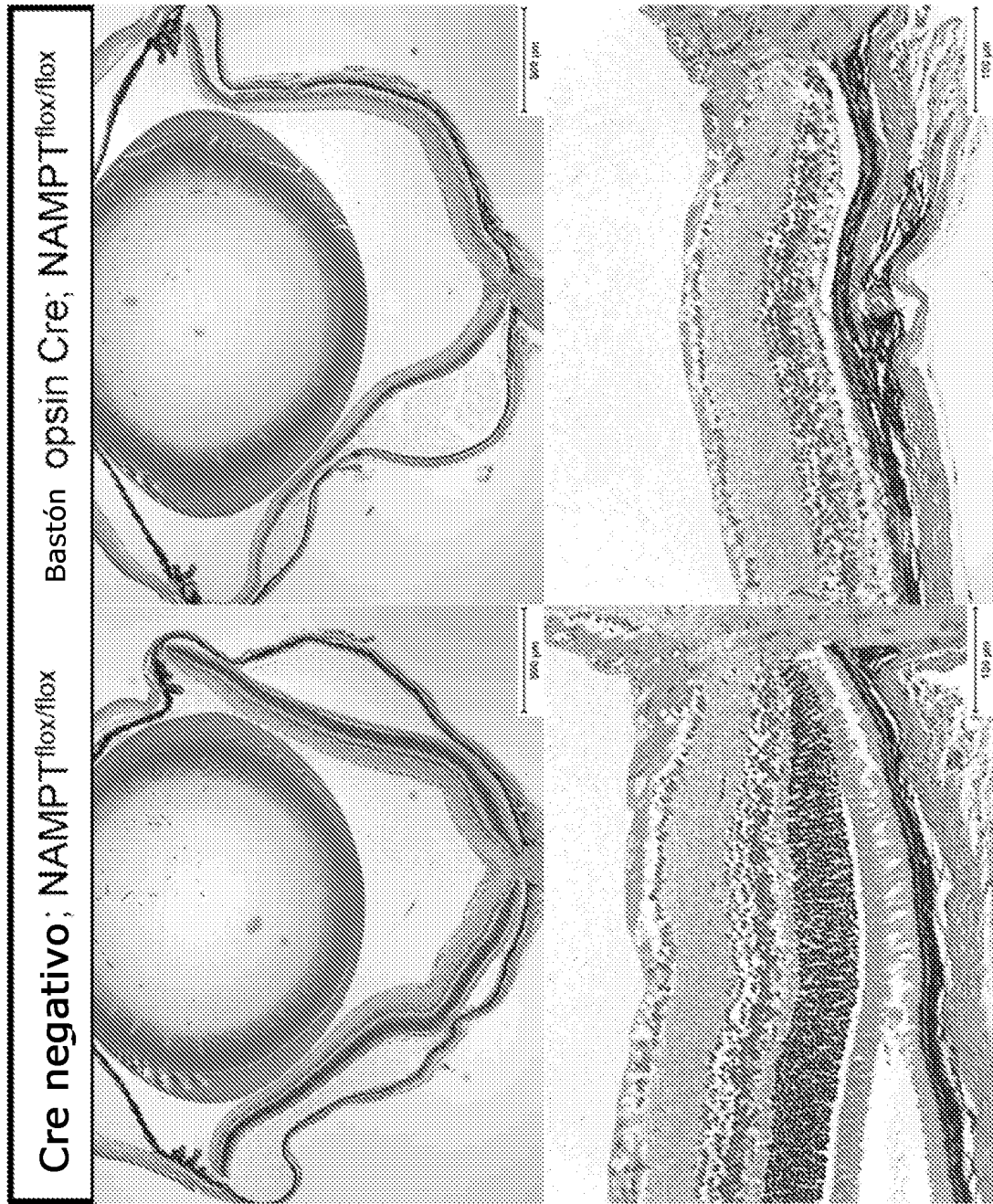


FIG. 30 I-J

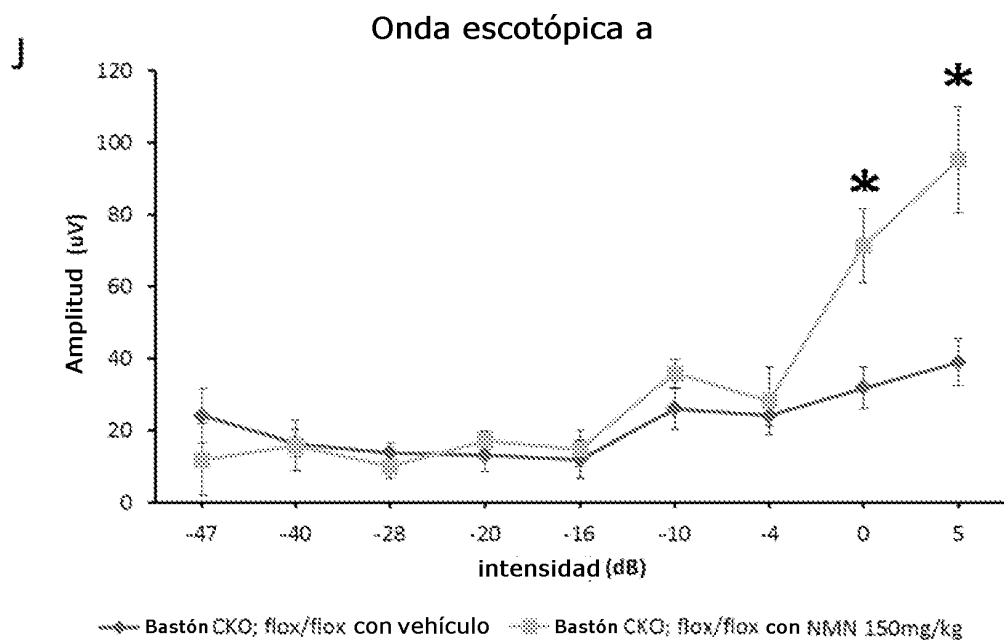
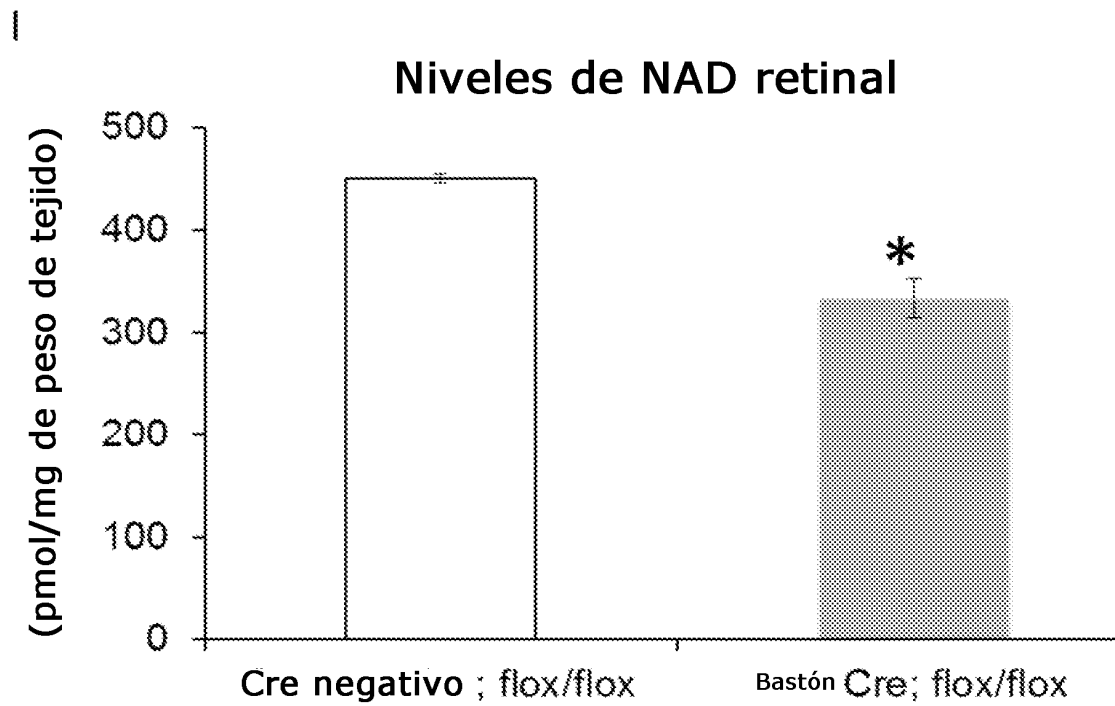
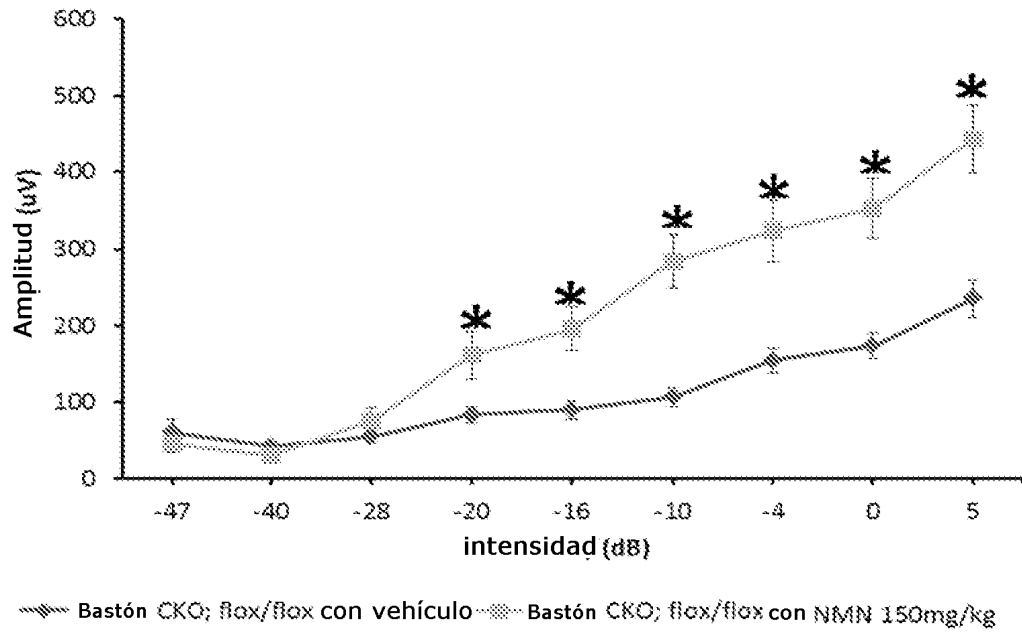


FIG. 30 K-

K

Onda escotópica a



L

Onda fotópica b

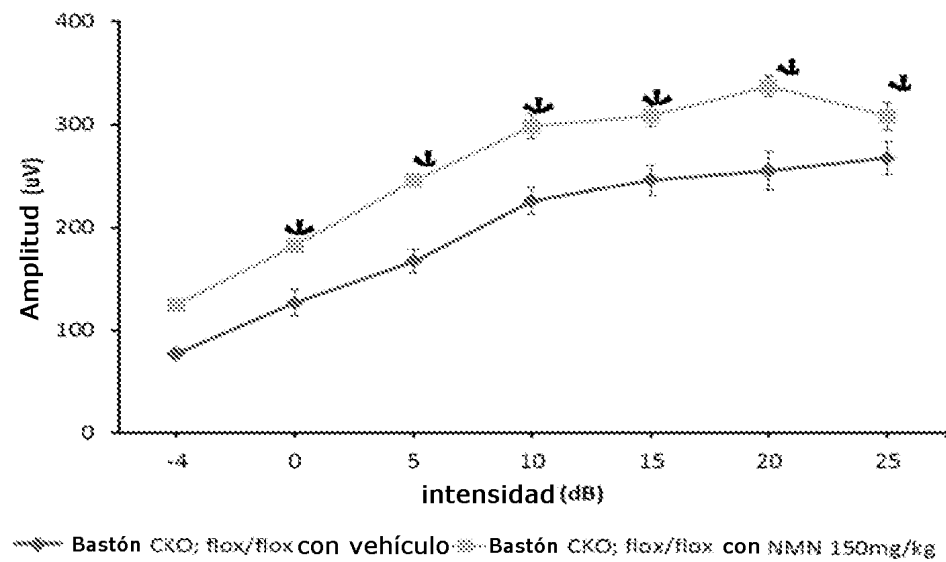


FIG. 31 A

A

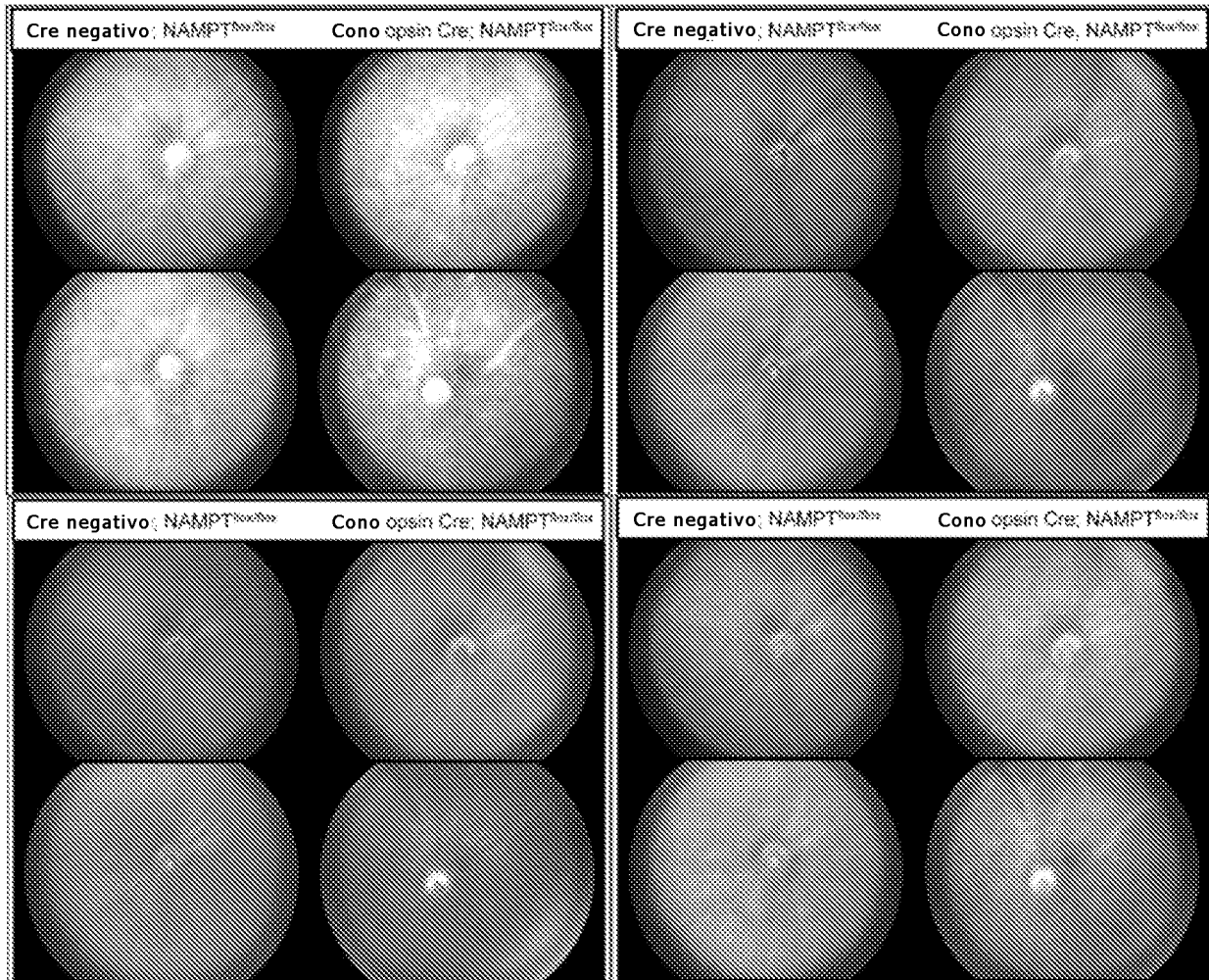


FIG. 31 B-C

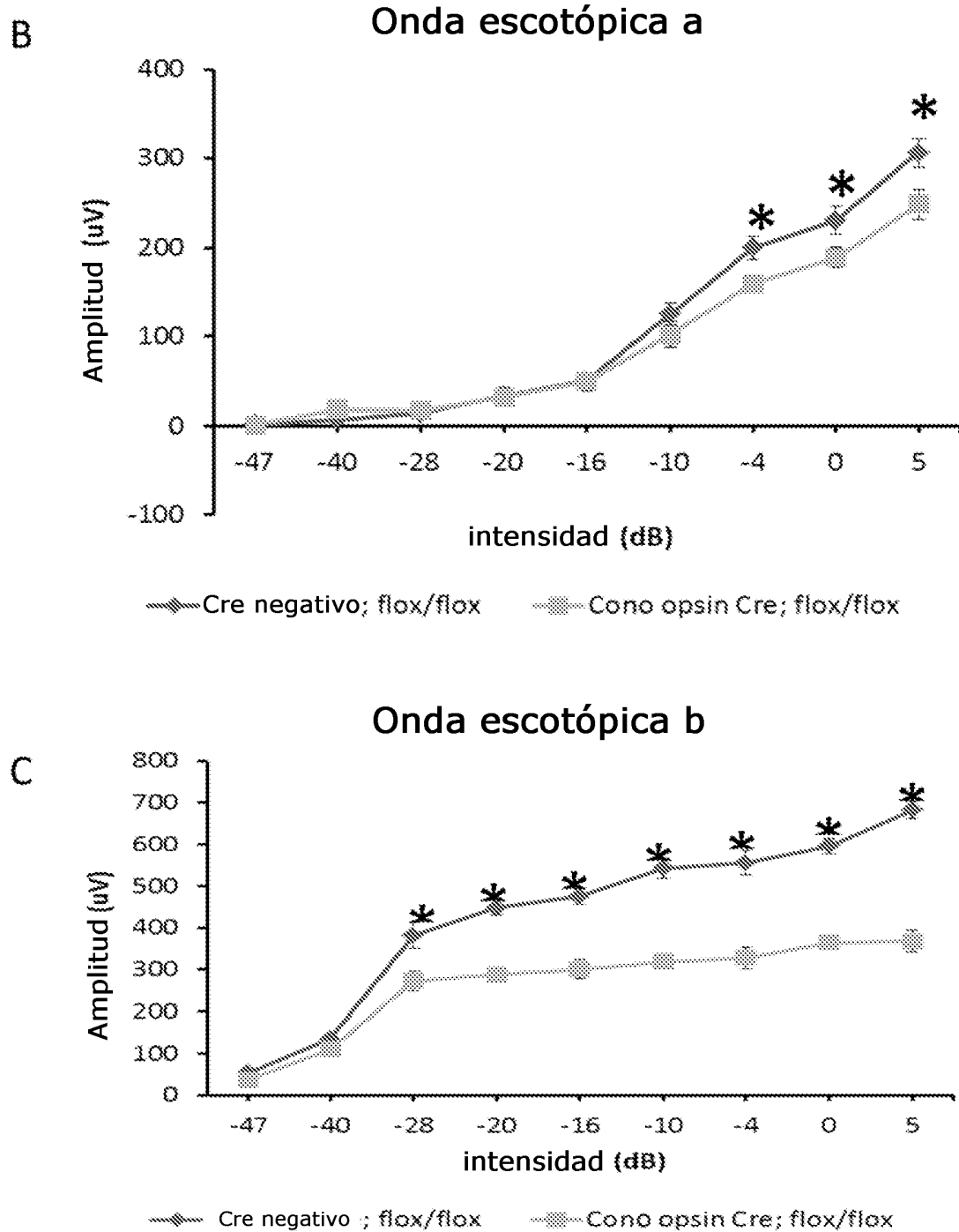
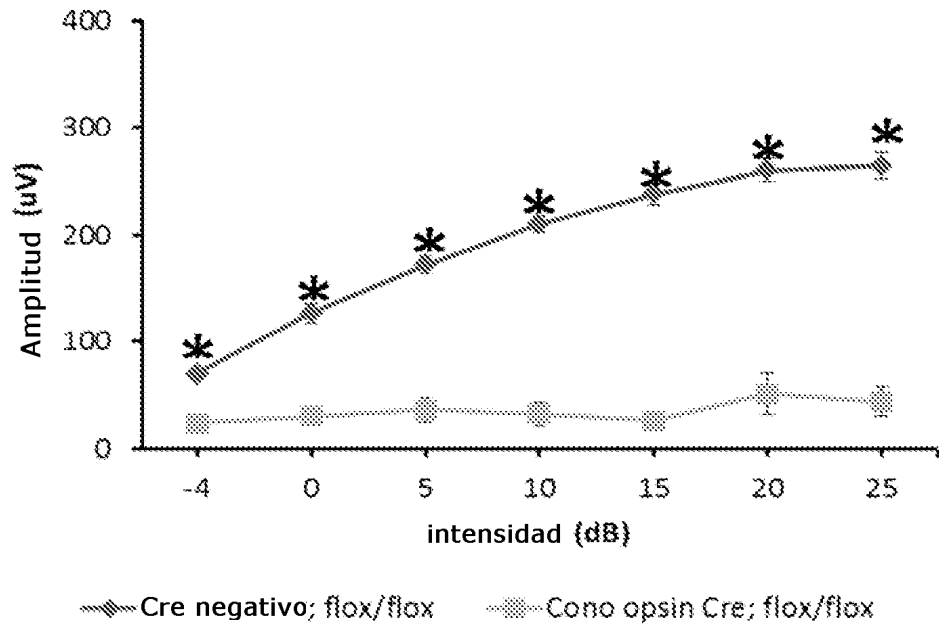


FIG. 31 D-E

D

Onda fotópica b



E

Agudeza visual

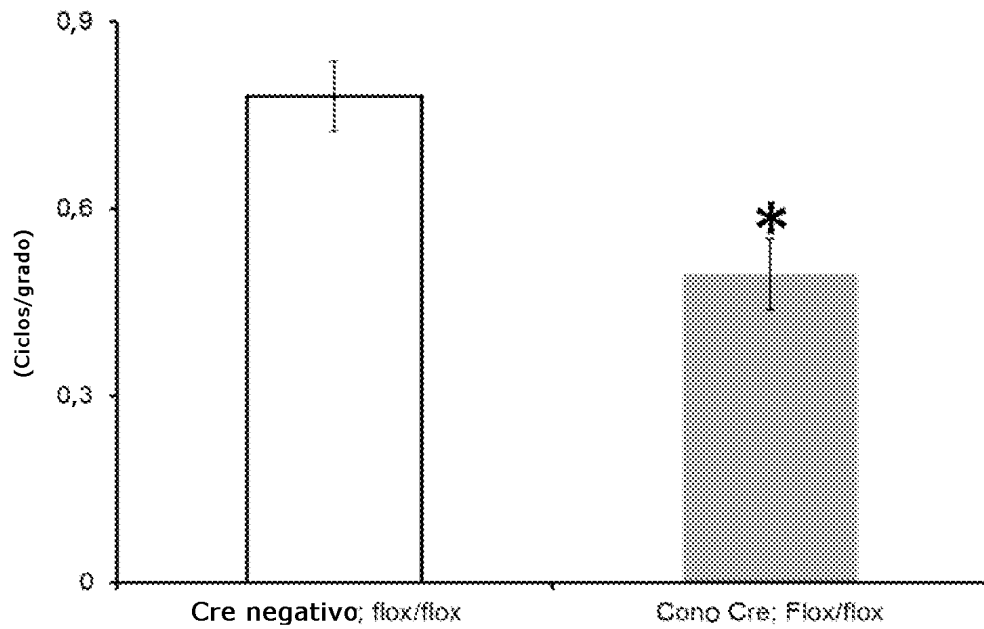
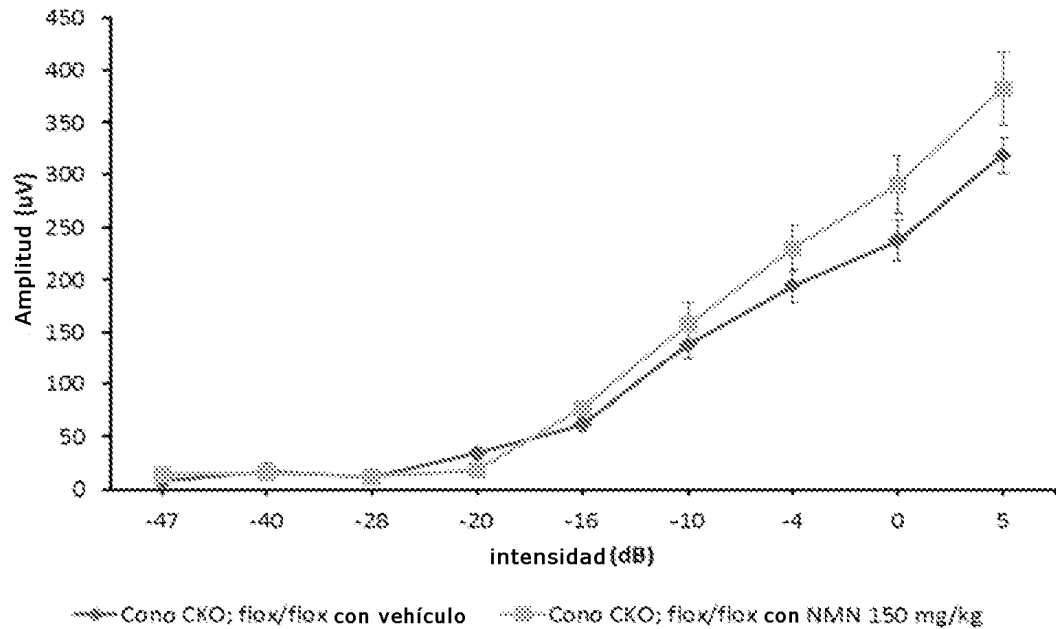


FIG. 31 F-G

F

Onda escotópica a



G

Onda escotópica b

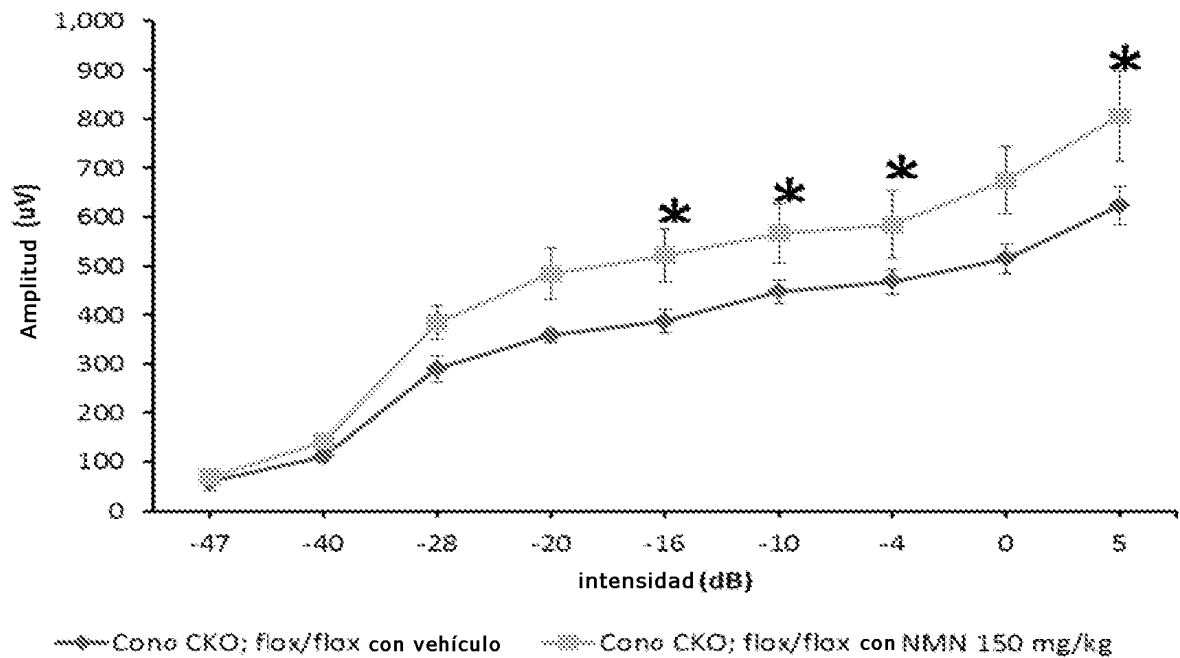
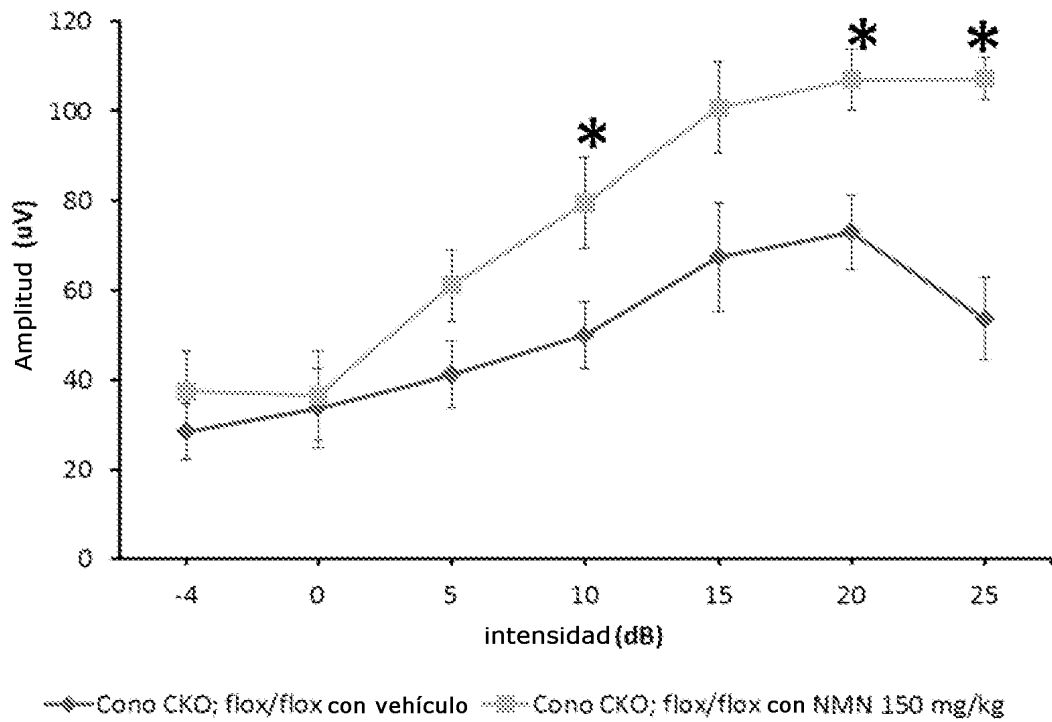


FIG. 31 H-I

H

Onda fotópica b



I

Niveles de NAD

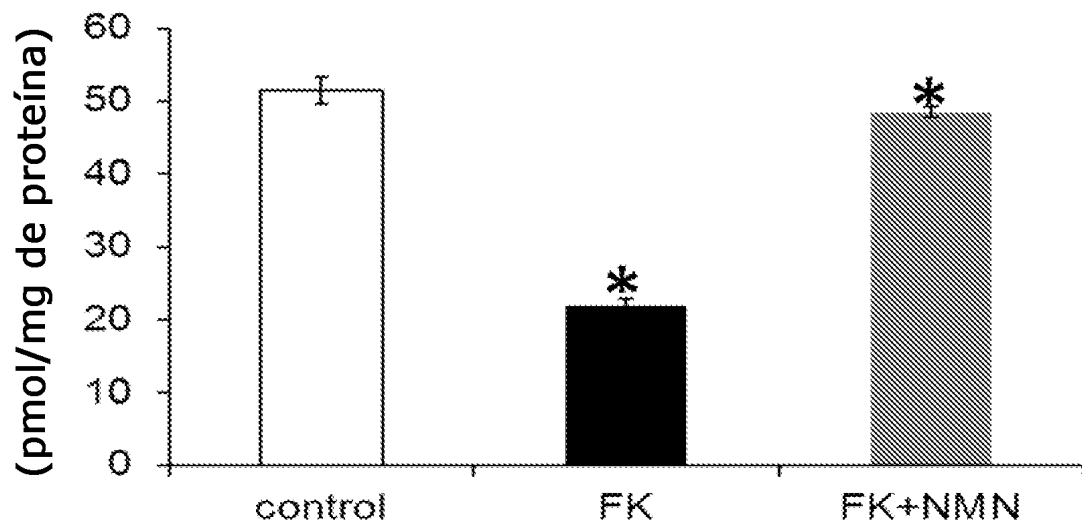


FIG. 31 J

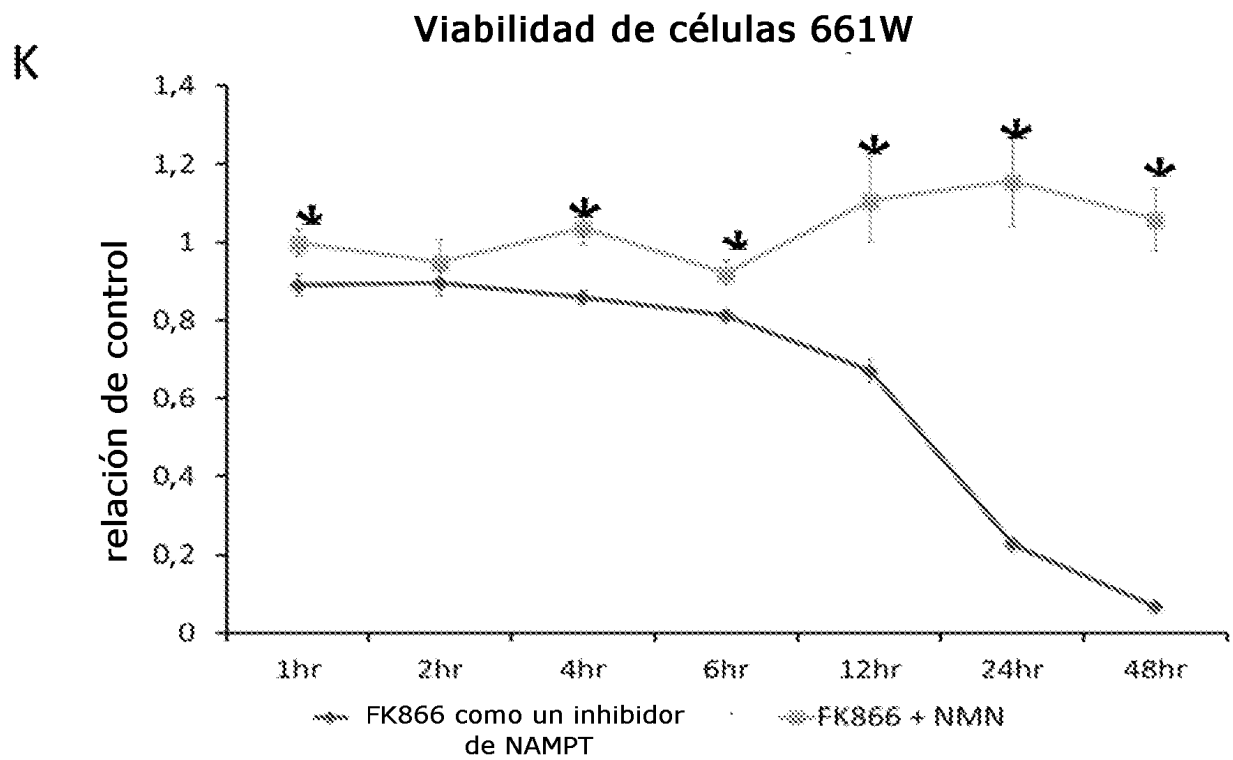
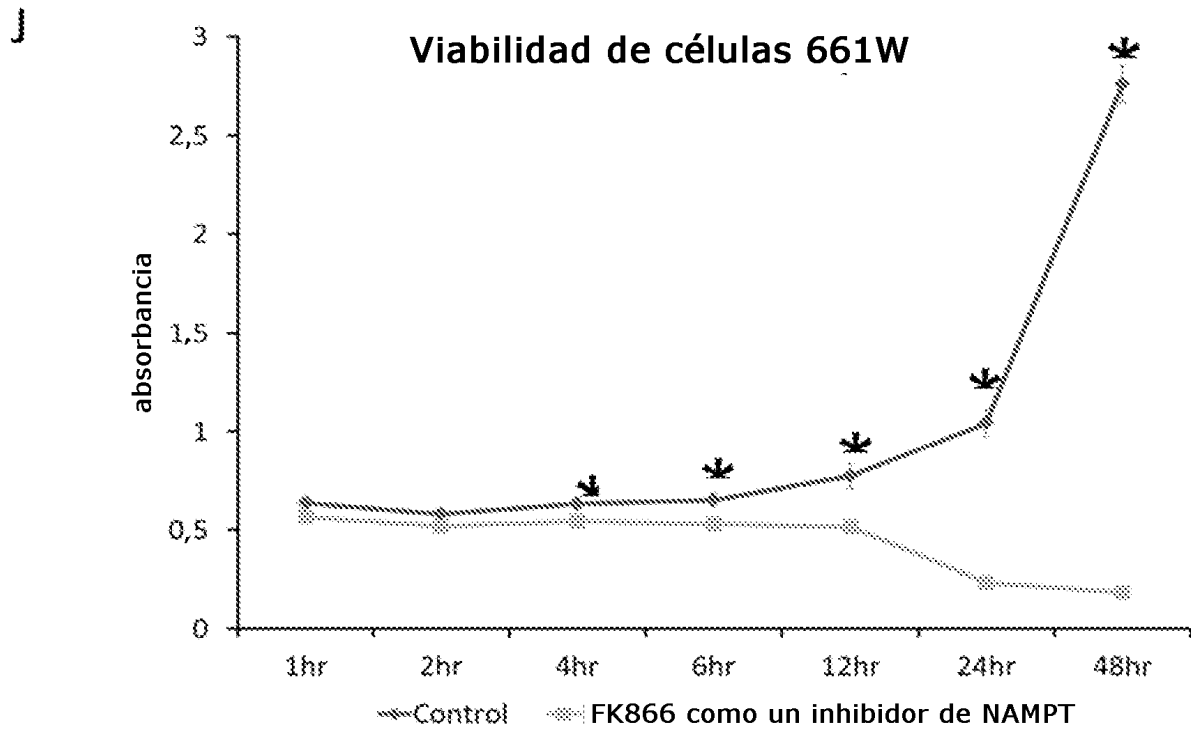


FIG. 31 L



FIG. 32

A

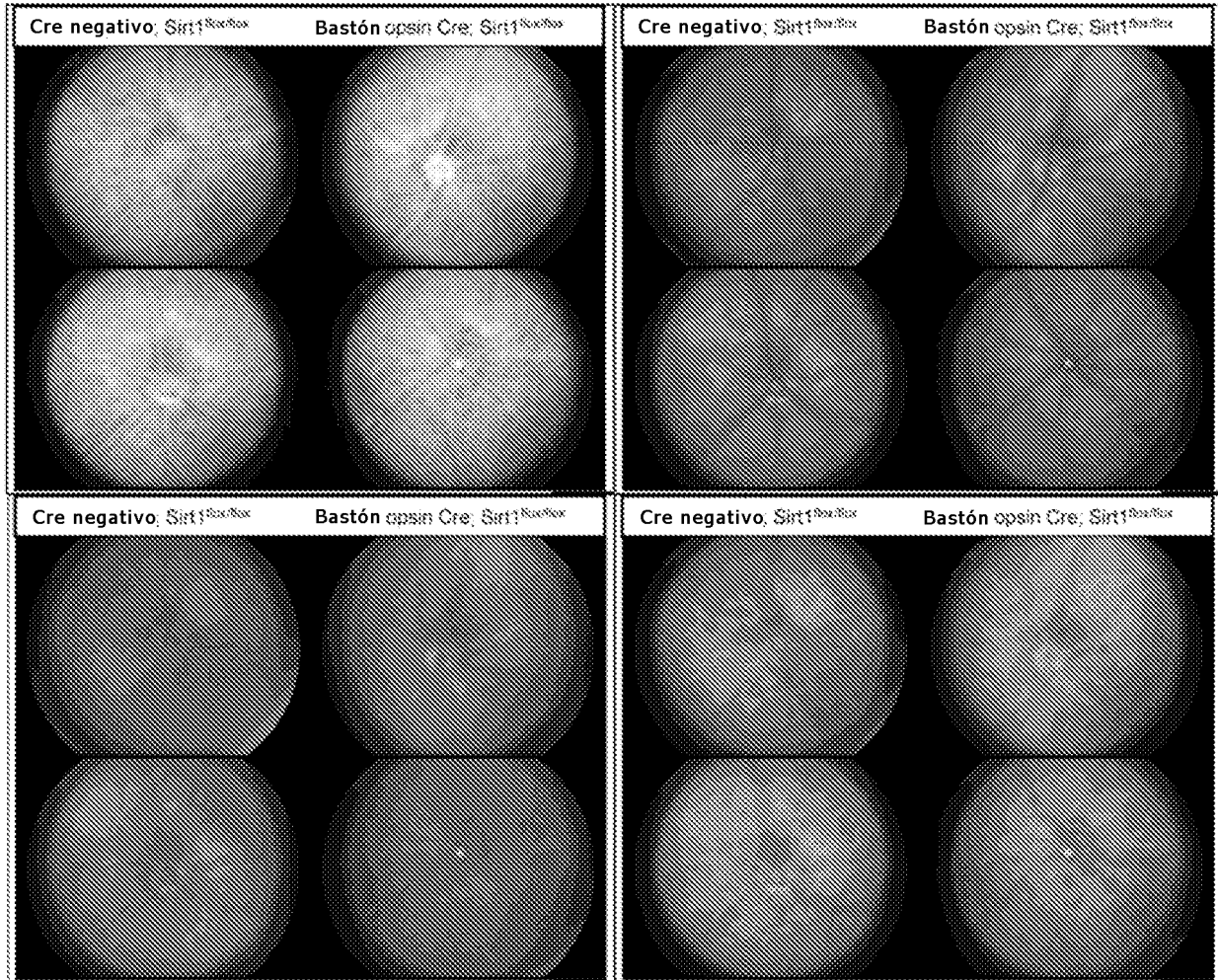


FIG. 32 A Continuación

A

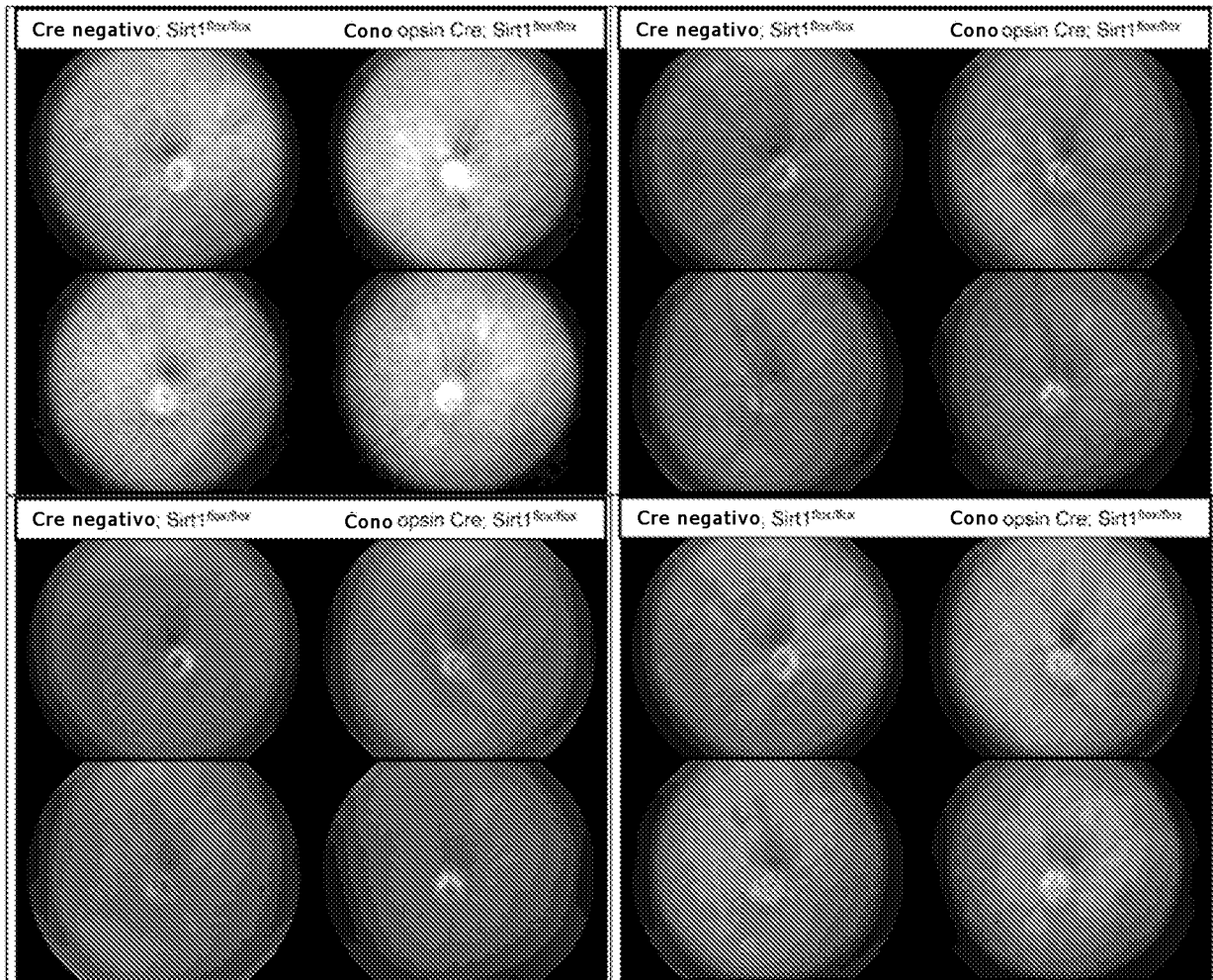


FIG. 32 B

B

Onda escotópica a

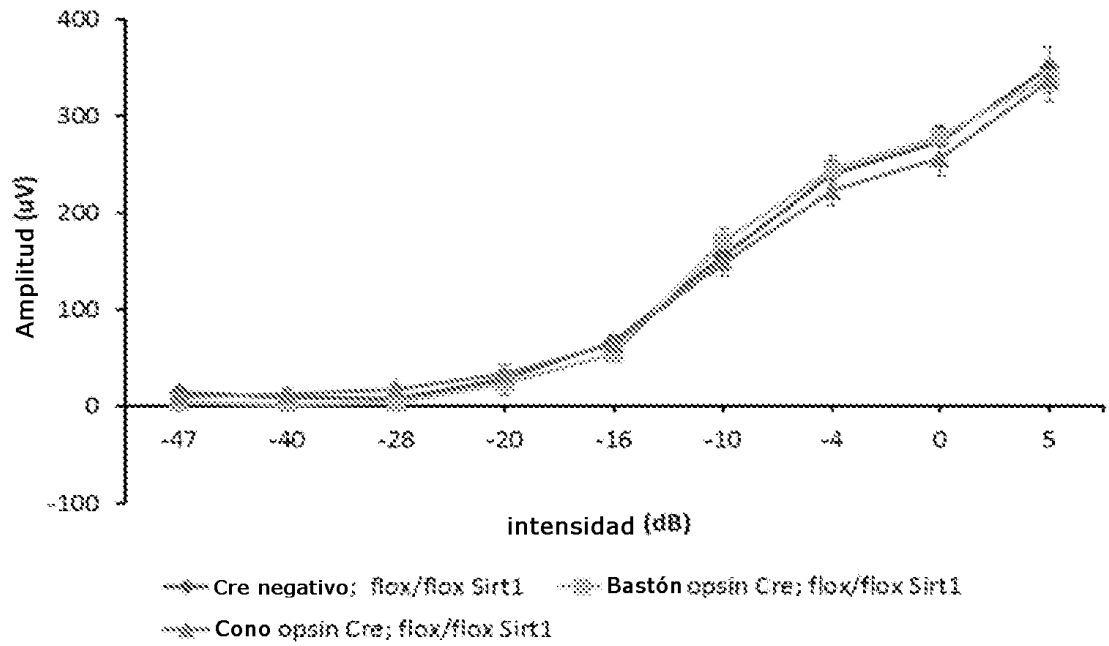
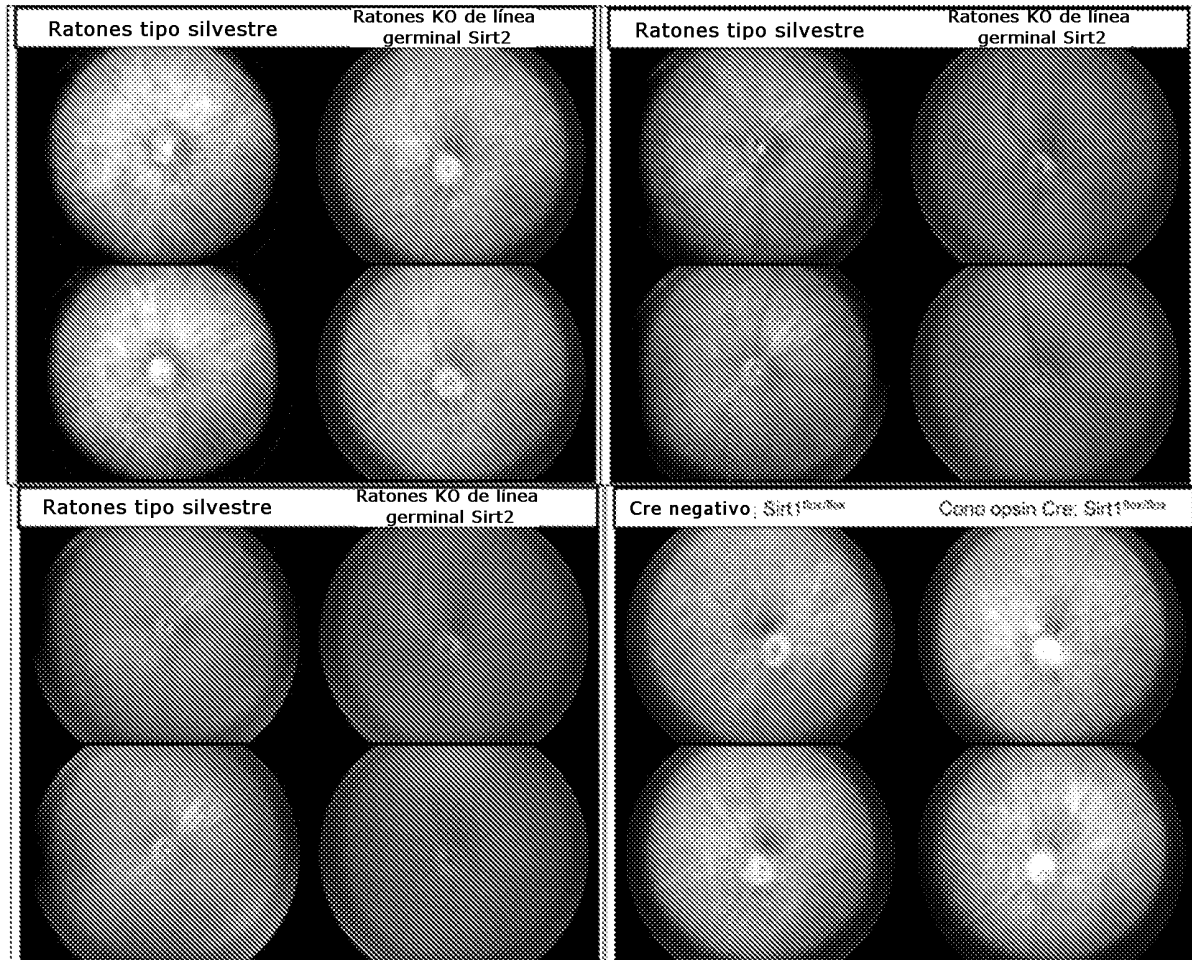


FIG. 32 C

C



8 semanas

FIG. 32 D

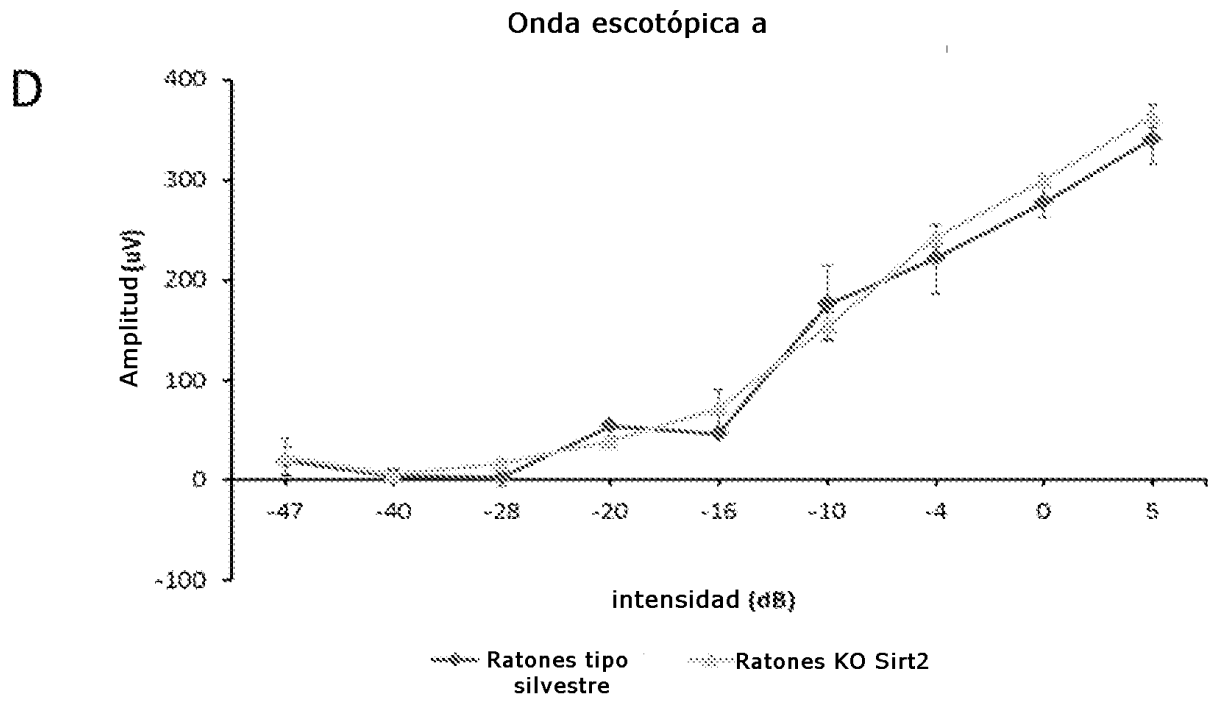
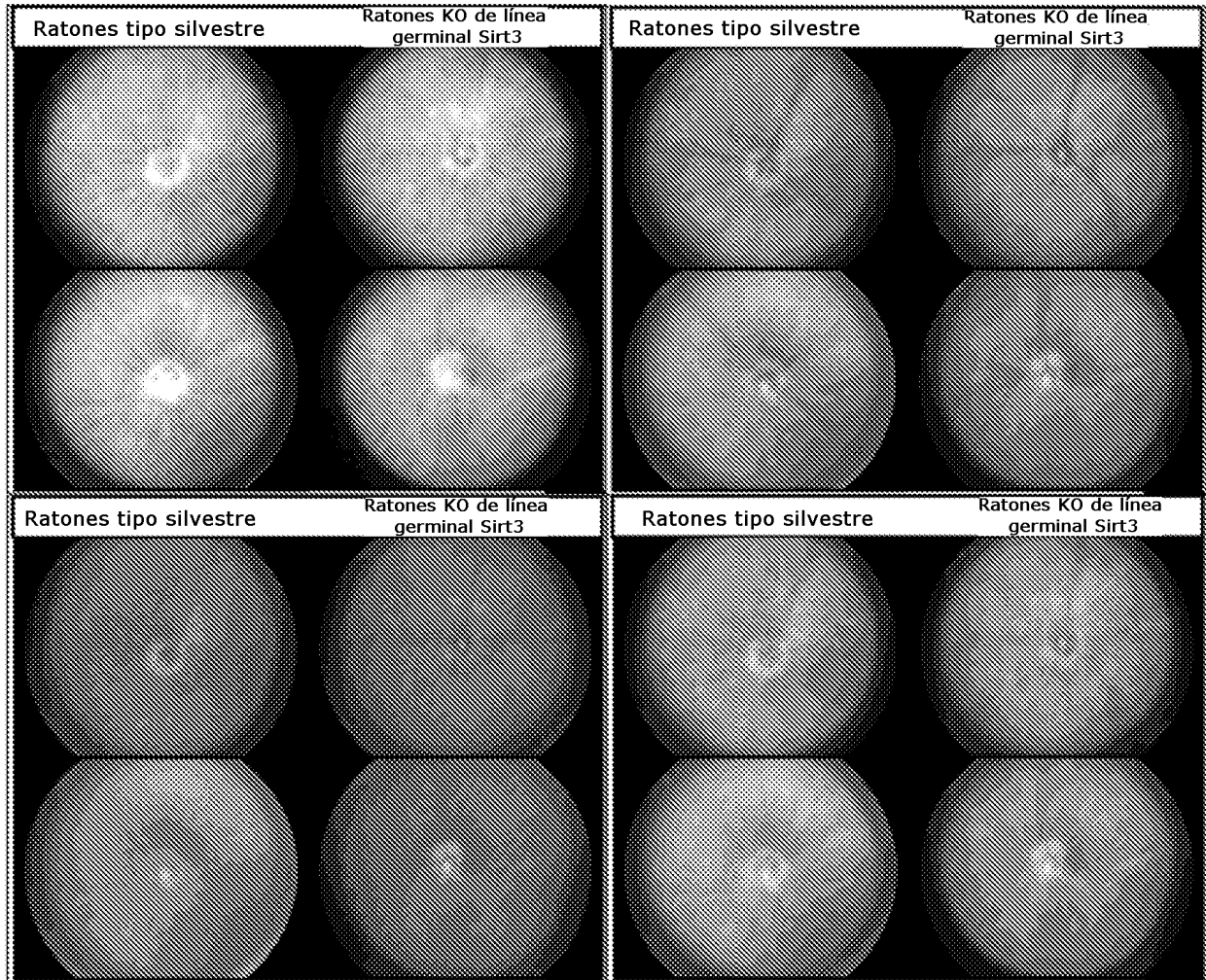


FIG. 32 E

E



7 semanas

FIG. 32 F

F

Onda escotópica a

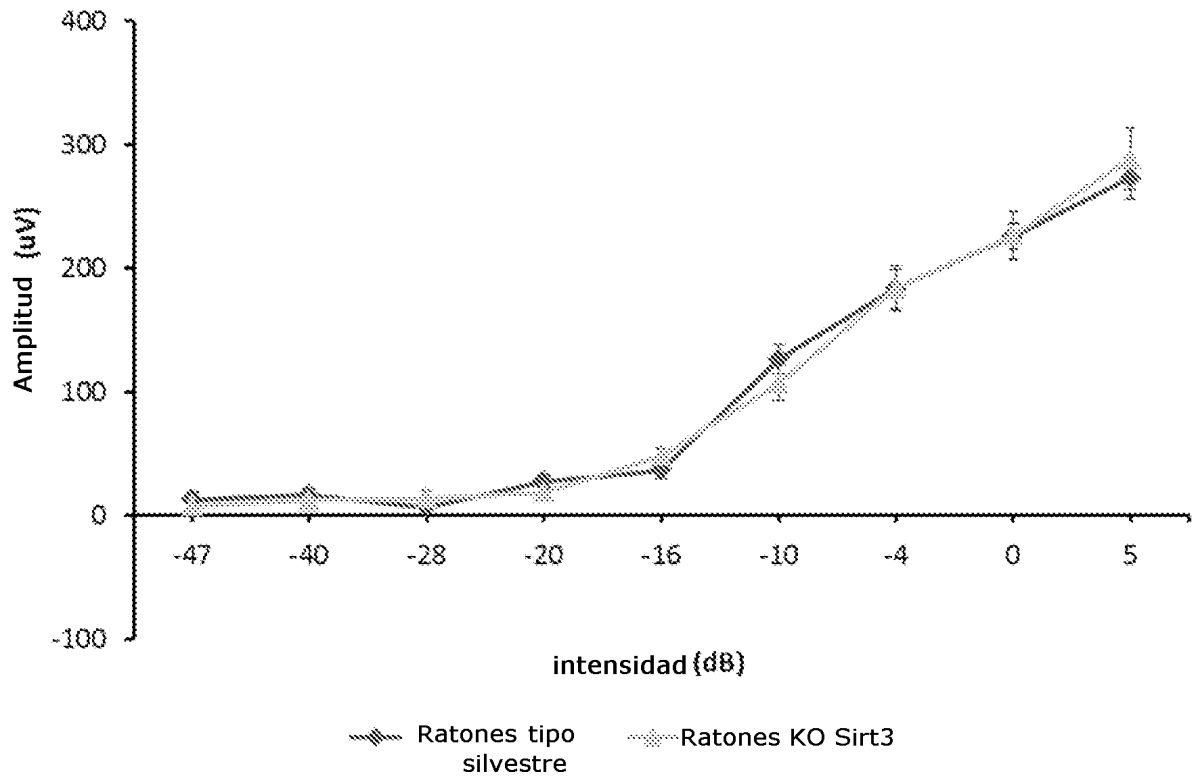
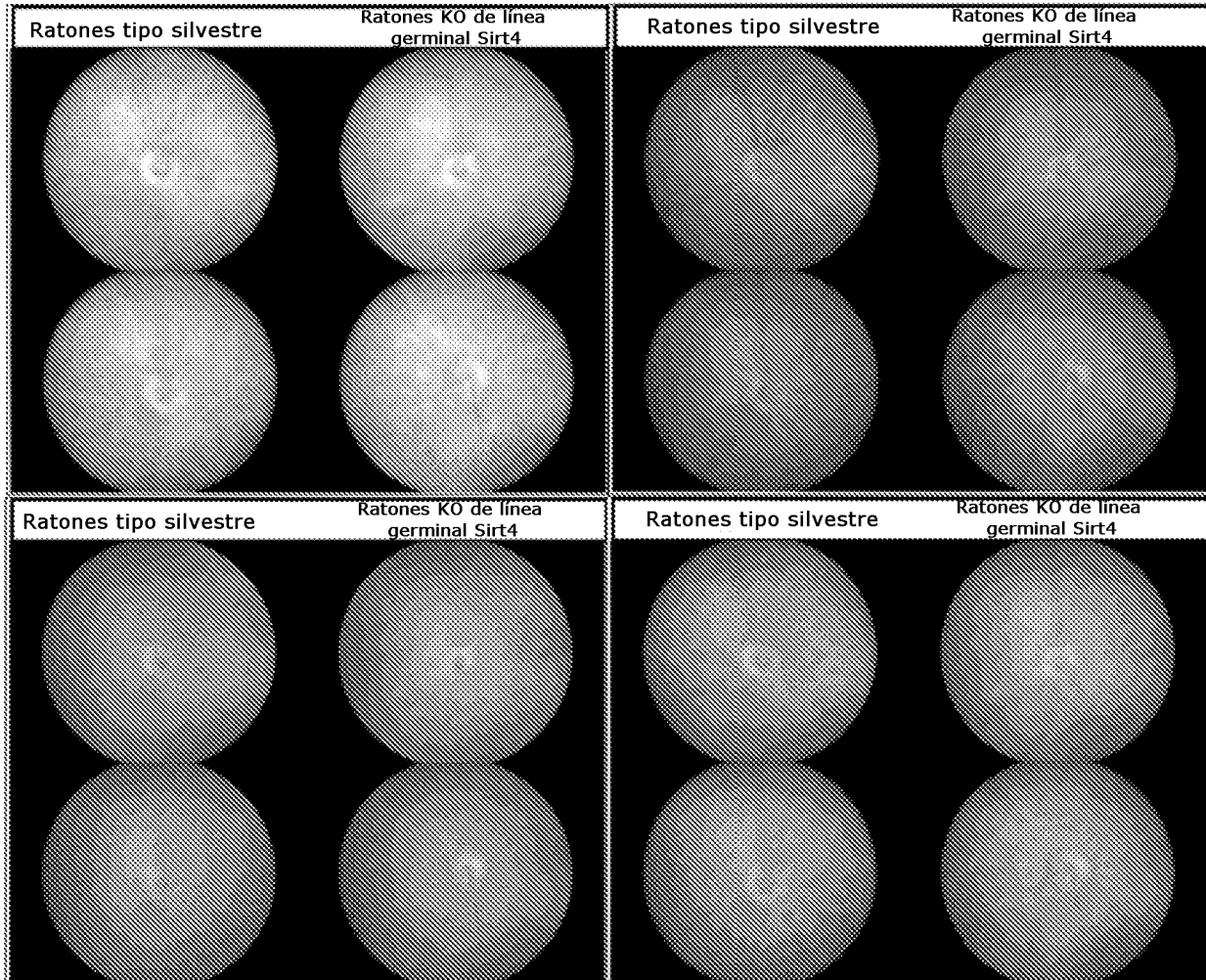


FIG. 32 G

G



11 semanas

FIG. 32 H

H

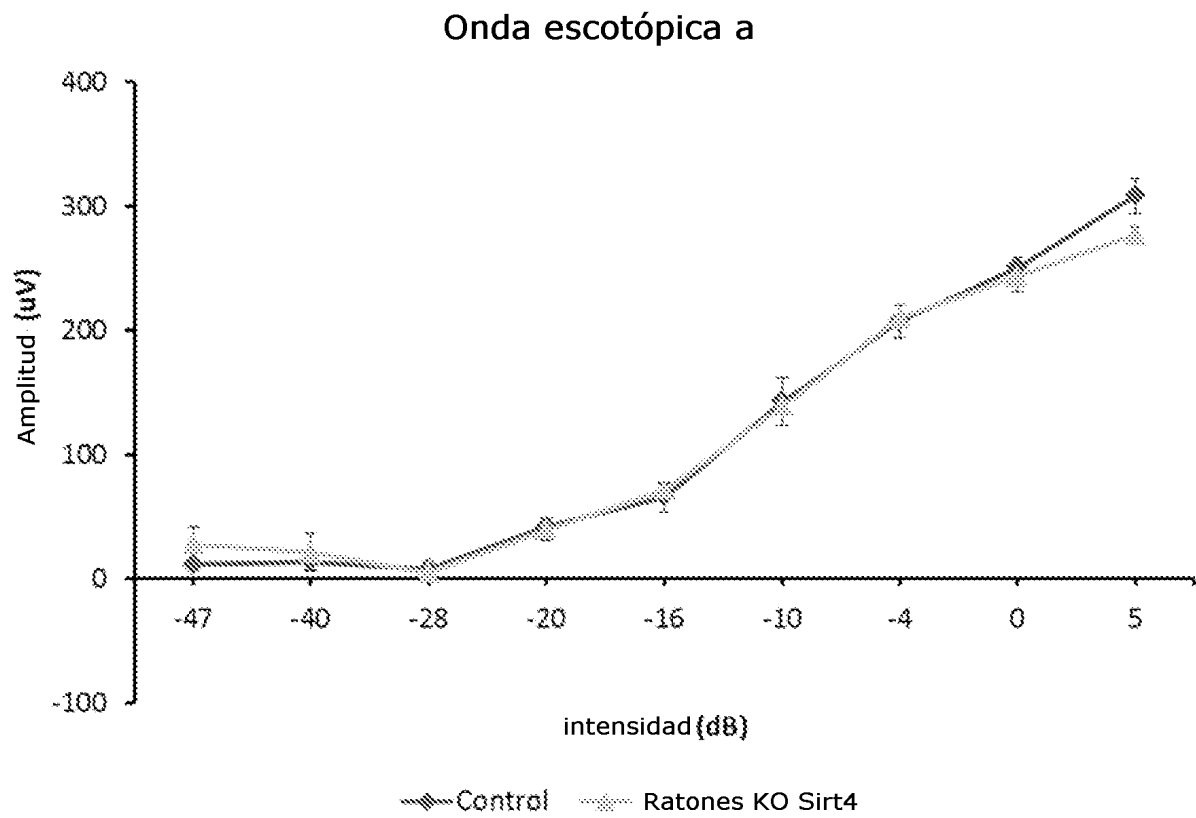
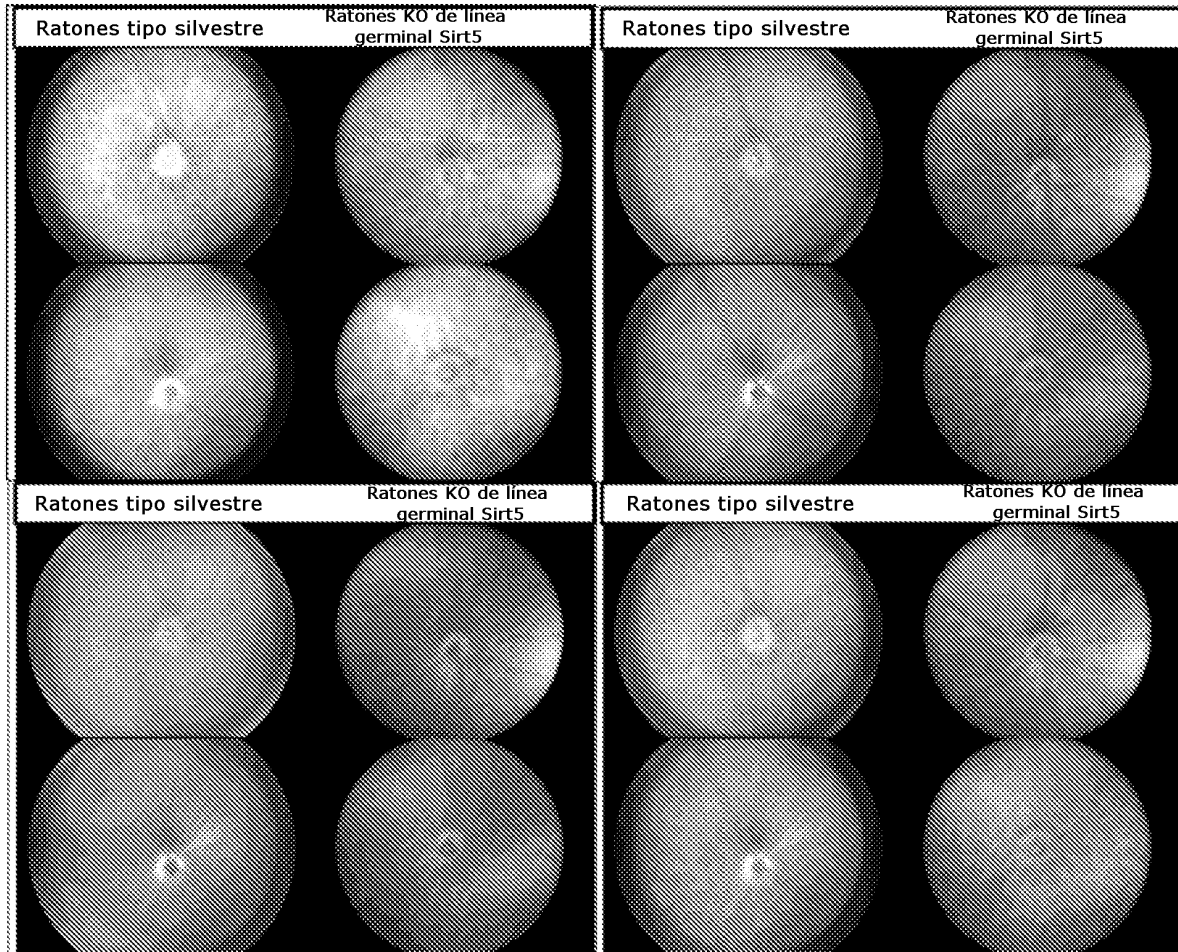


FIG. 32 I

I



12-13 semanas

FIG. 32 J

J

Onda escotópica a

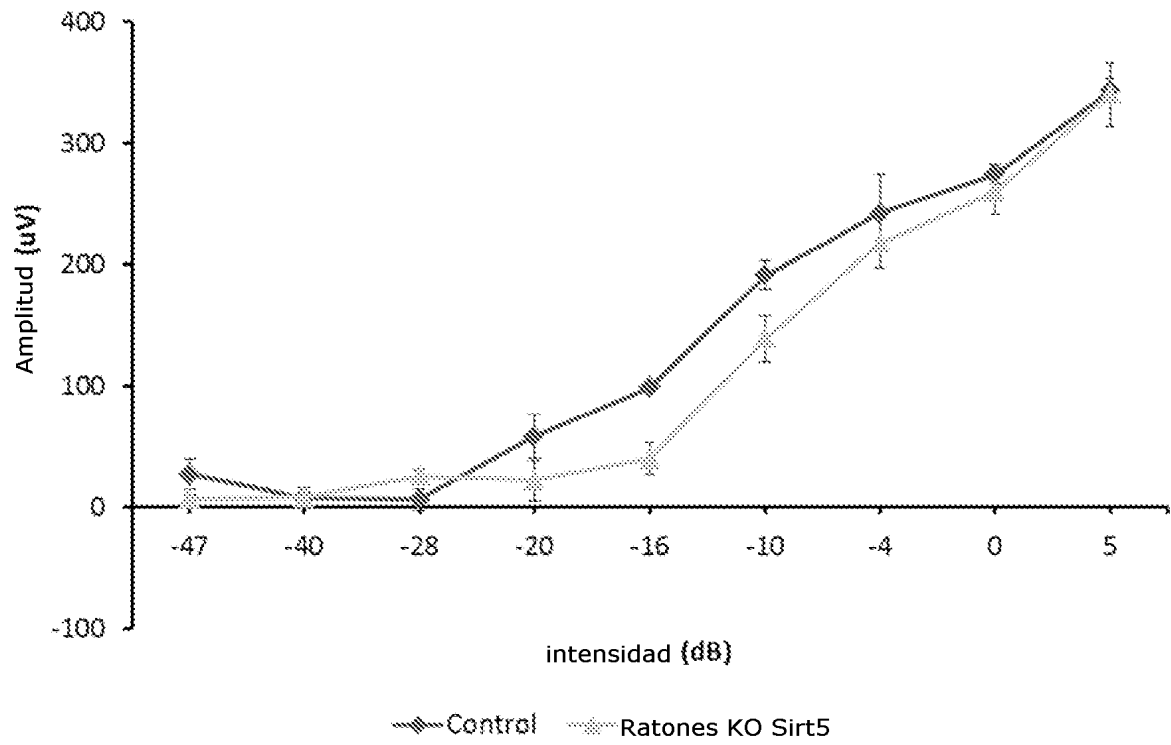


FIG. 32 K

K

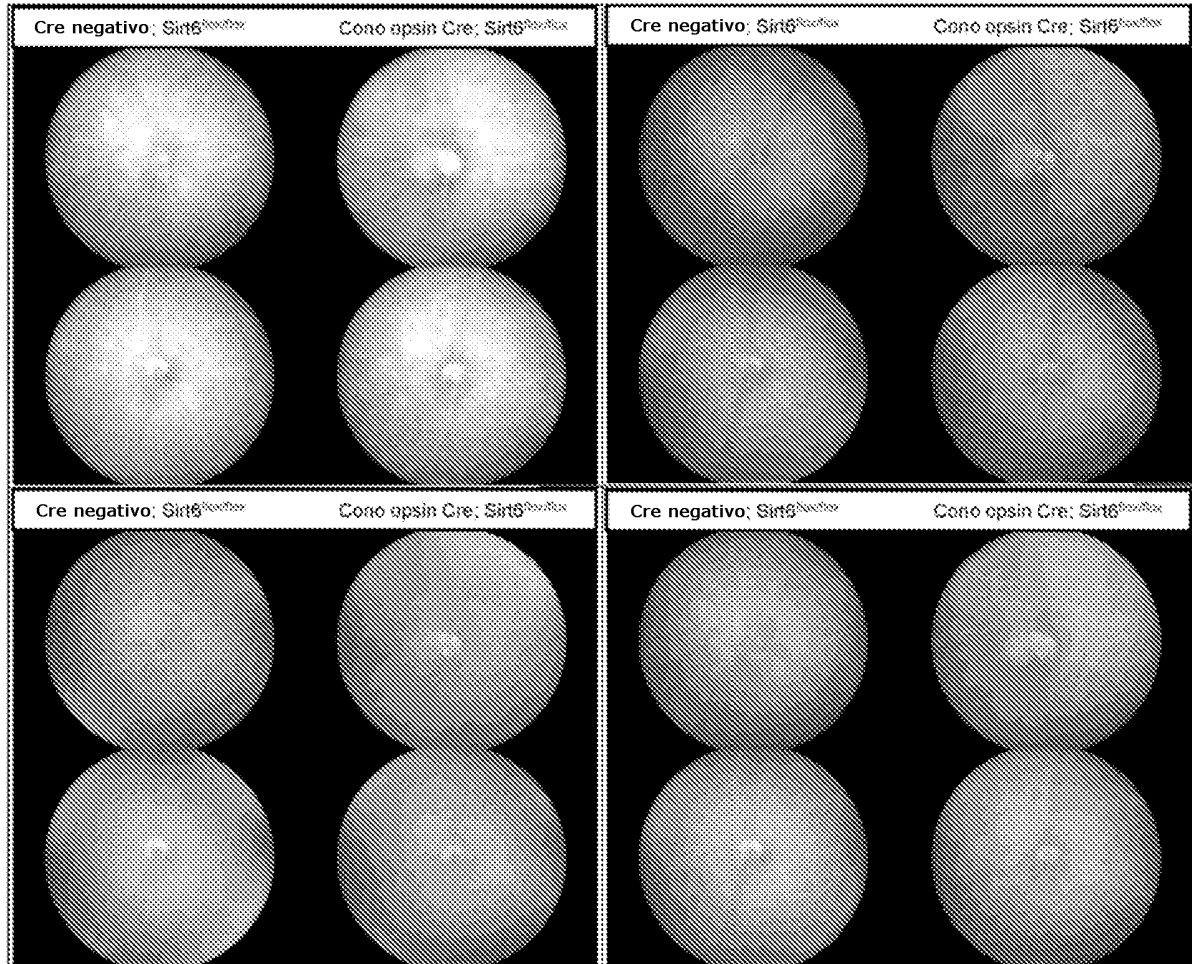


FIG. 32 K continuación

K

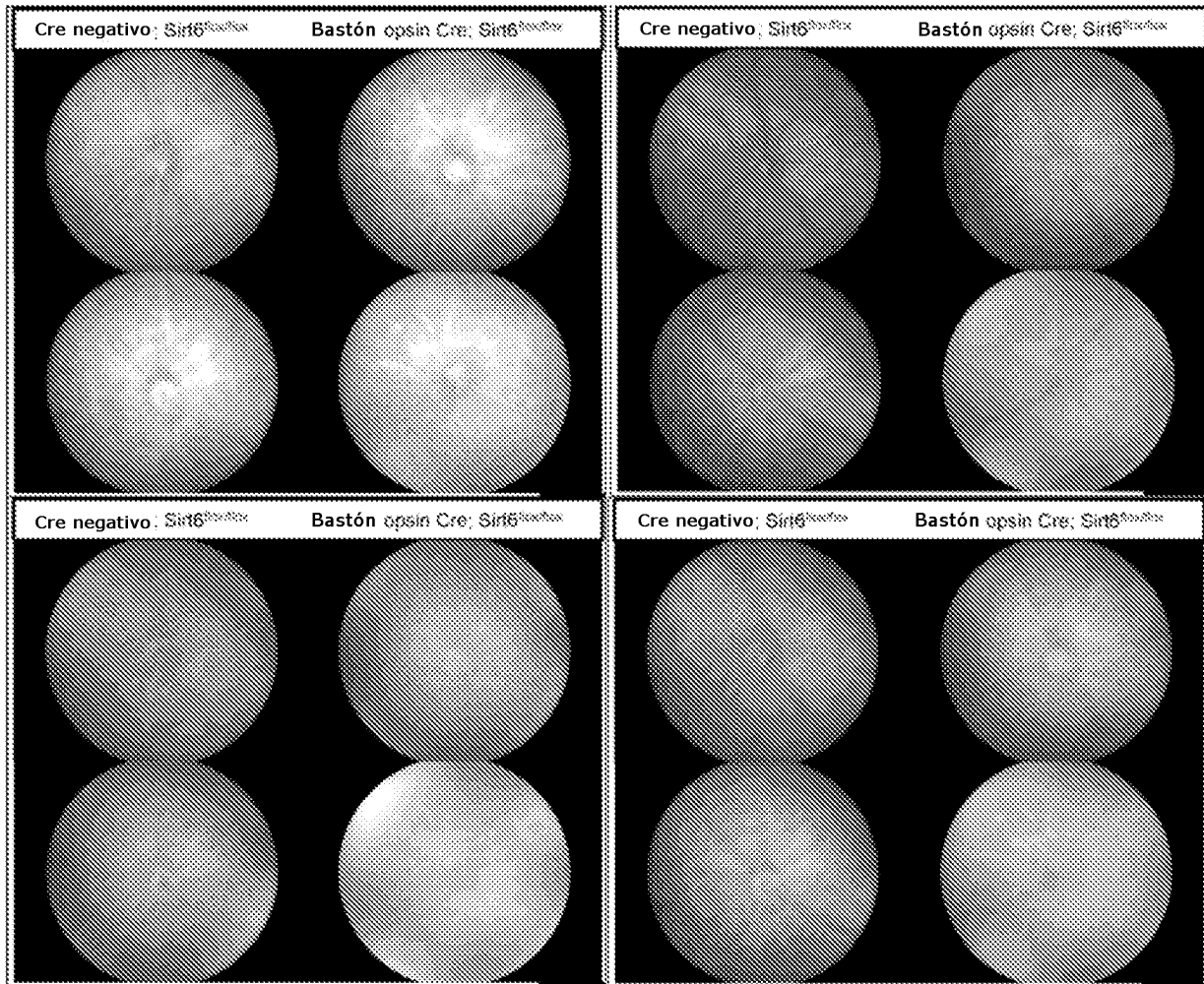


FIG. 32 L

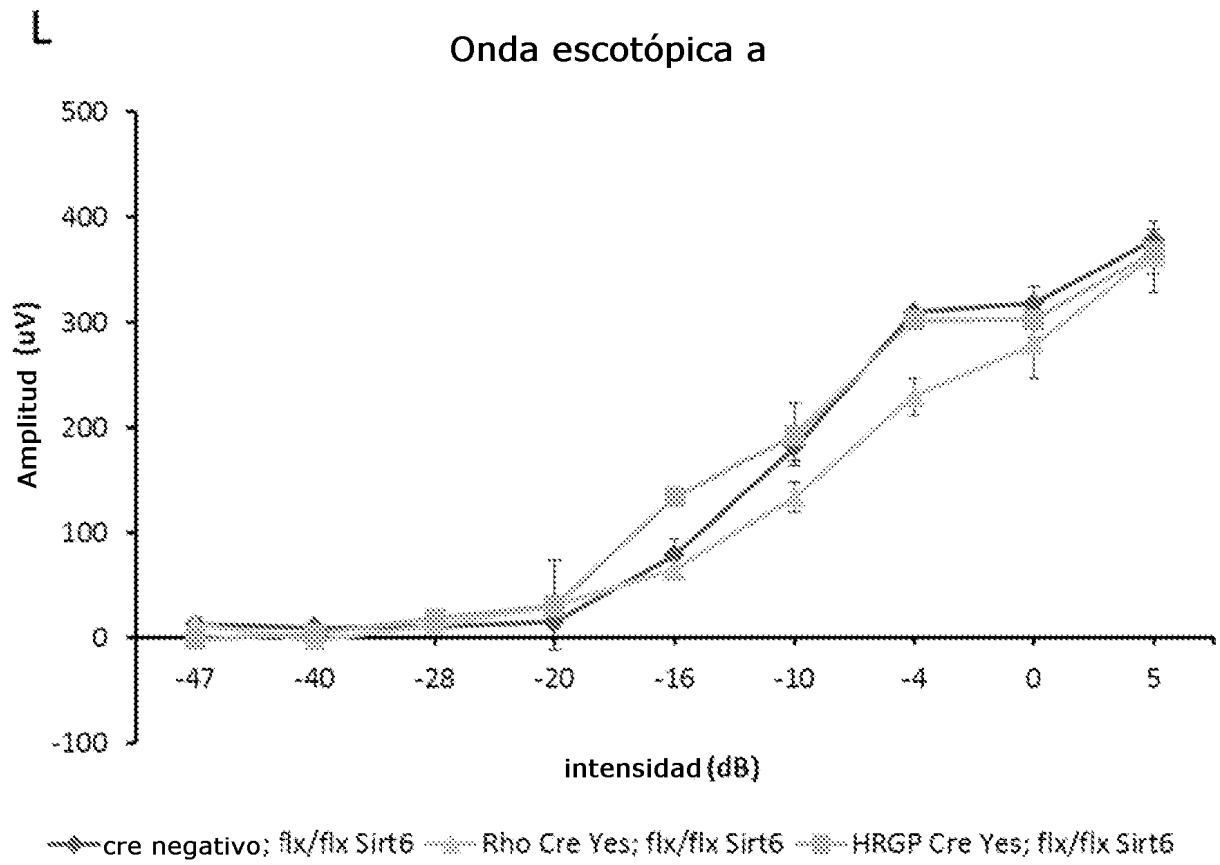


FIG. 33 A

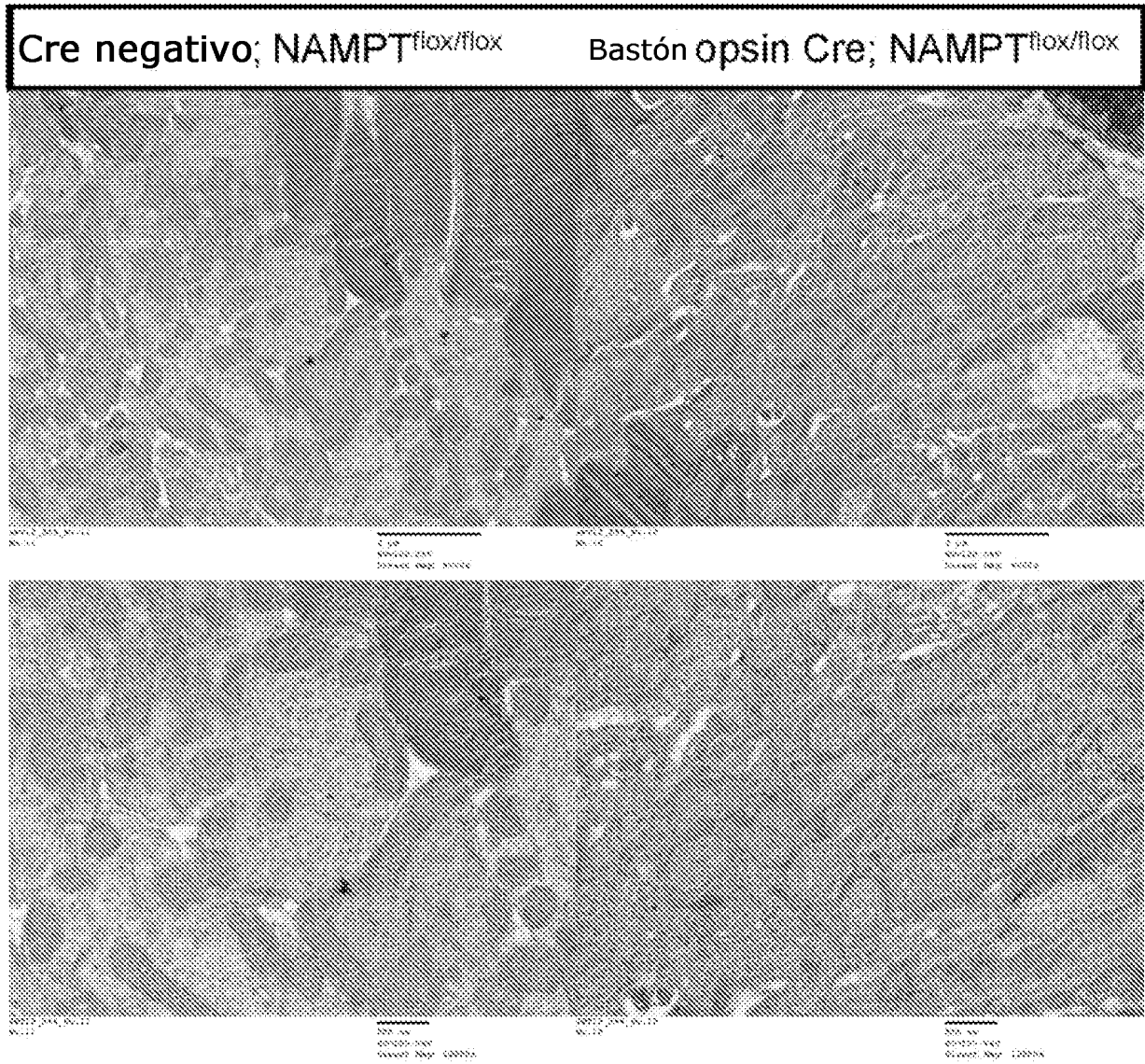


FIG. 33 A continuación

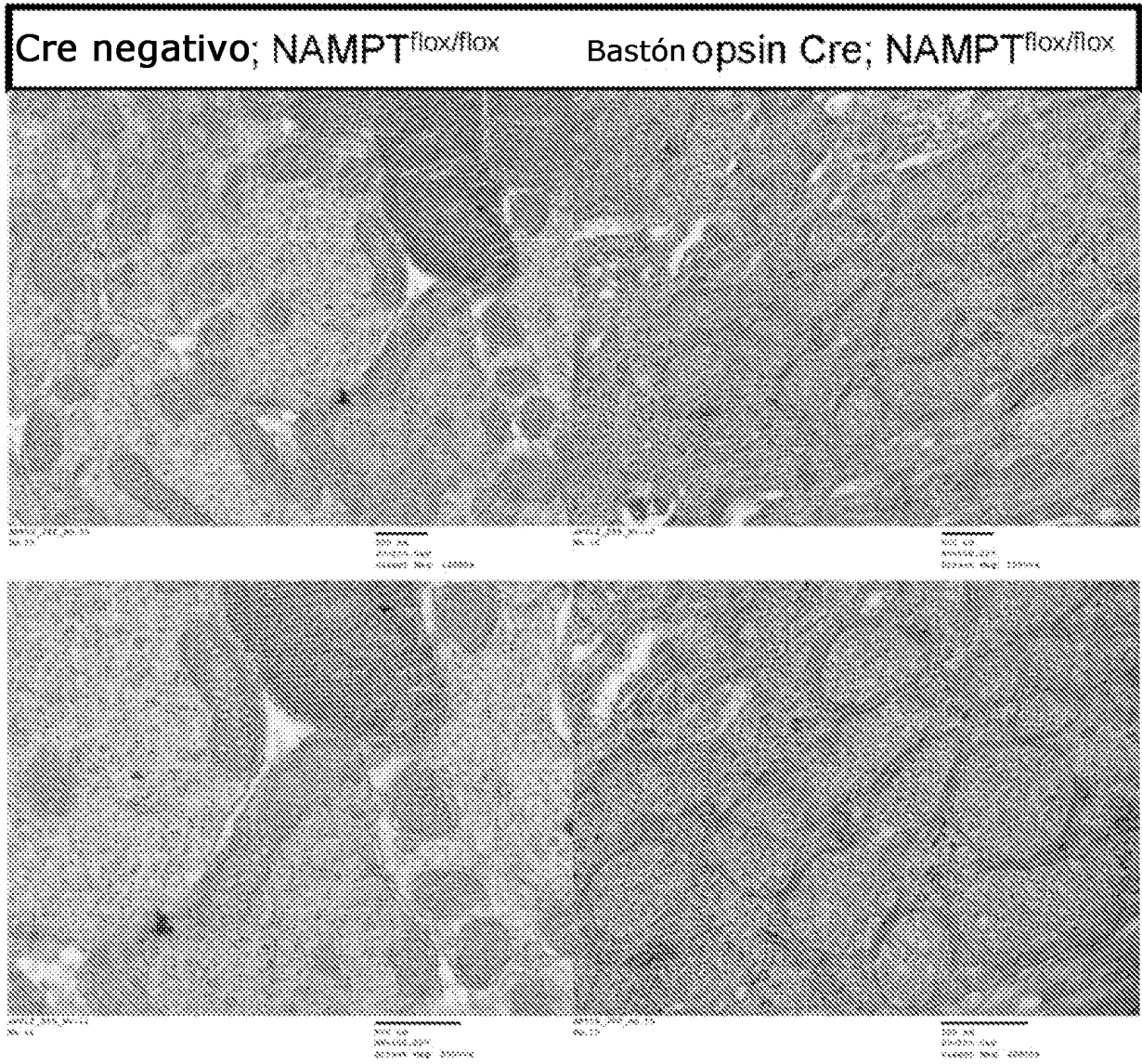


FIG. 33 A continuación

A

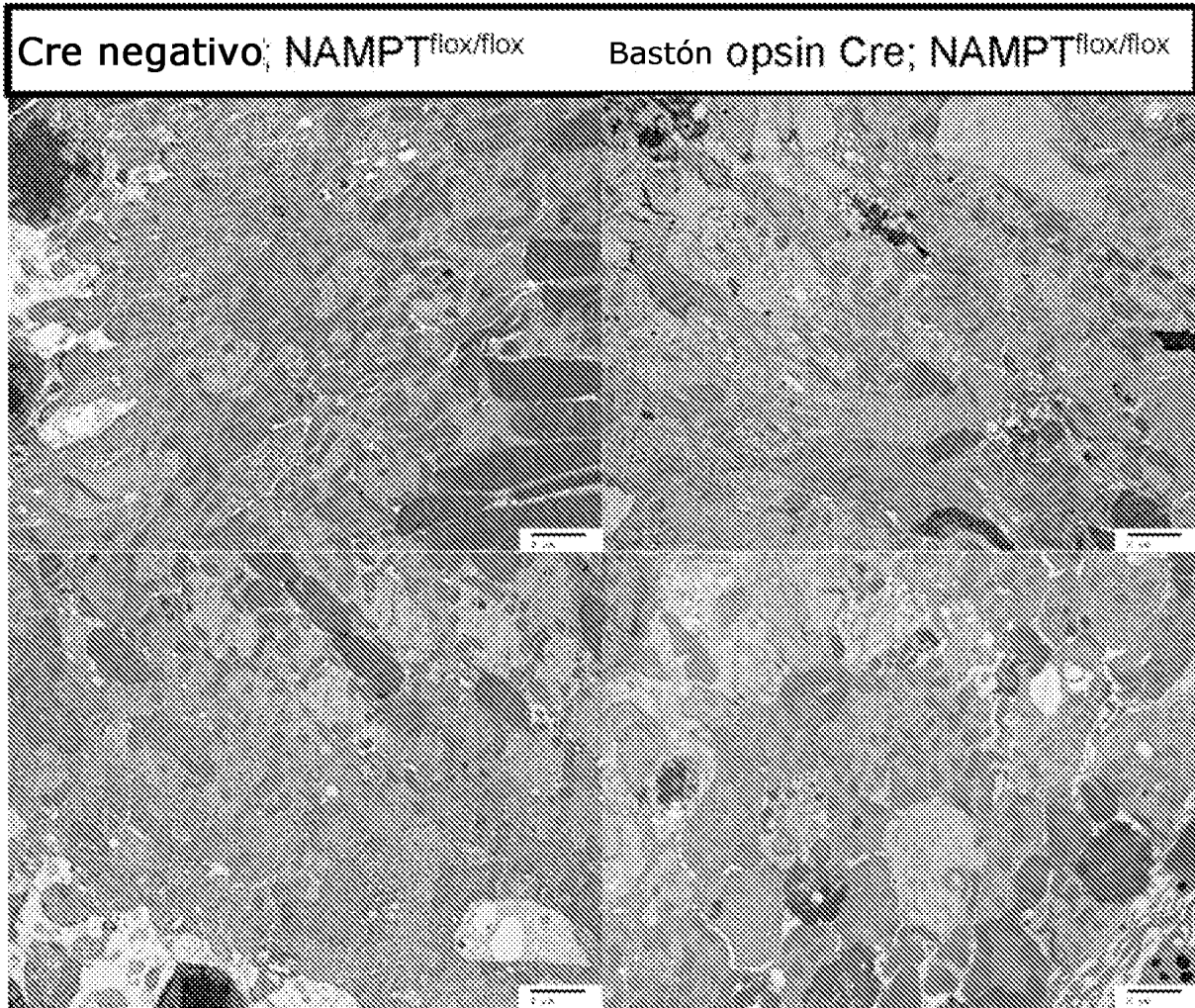


FIG. 33 B

B

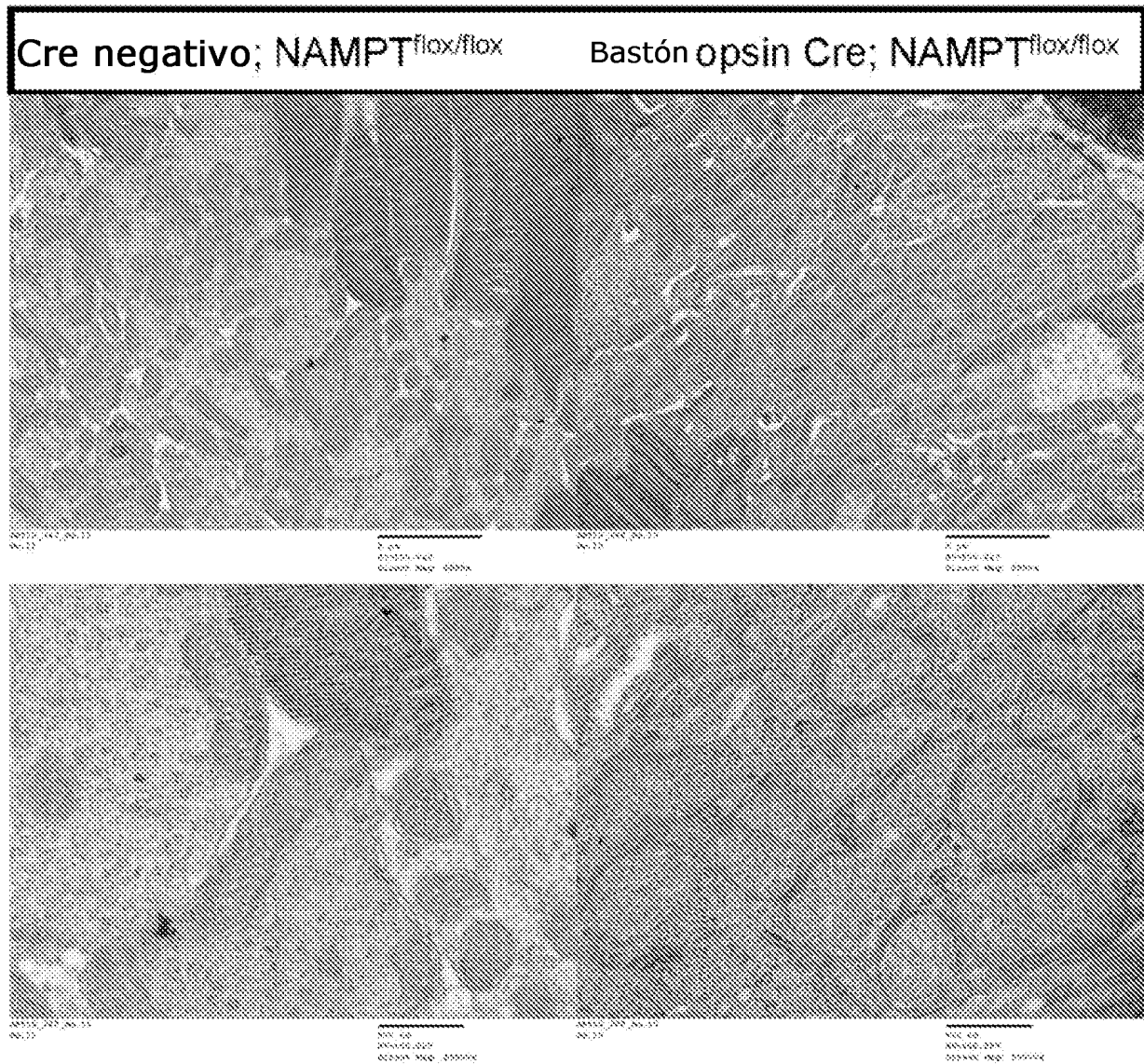


FIG. 33 C

C

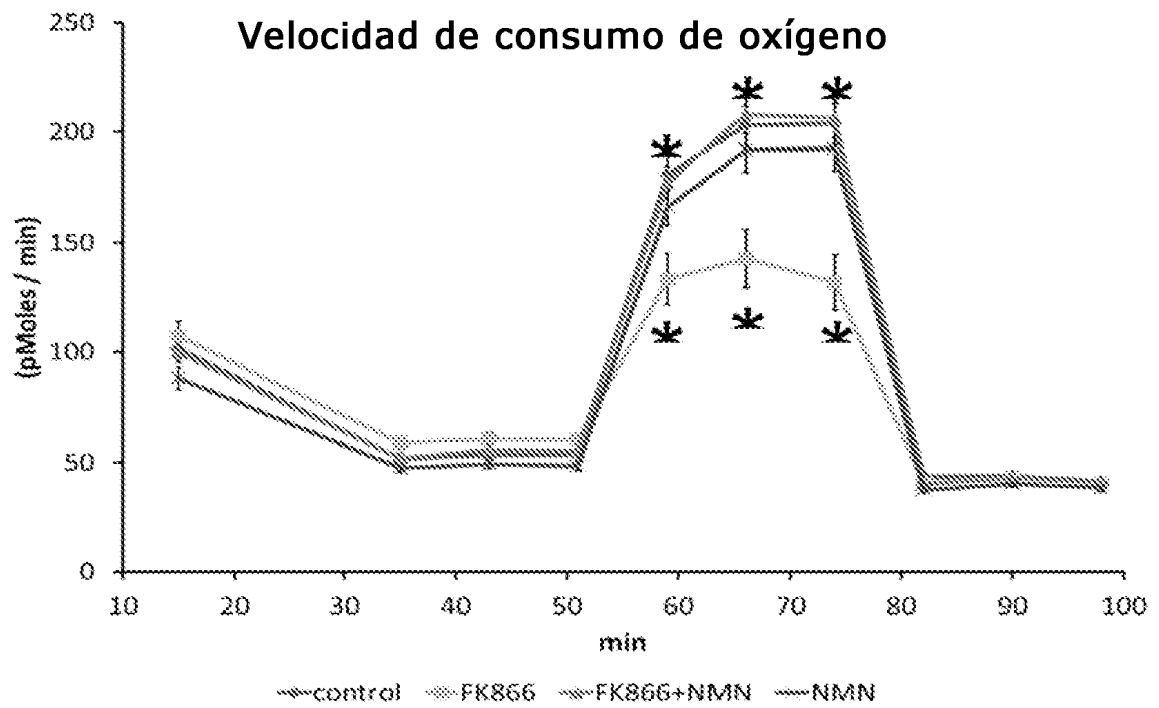


FIG. 34

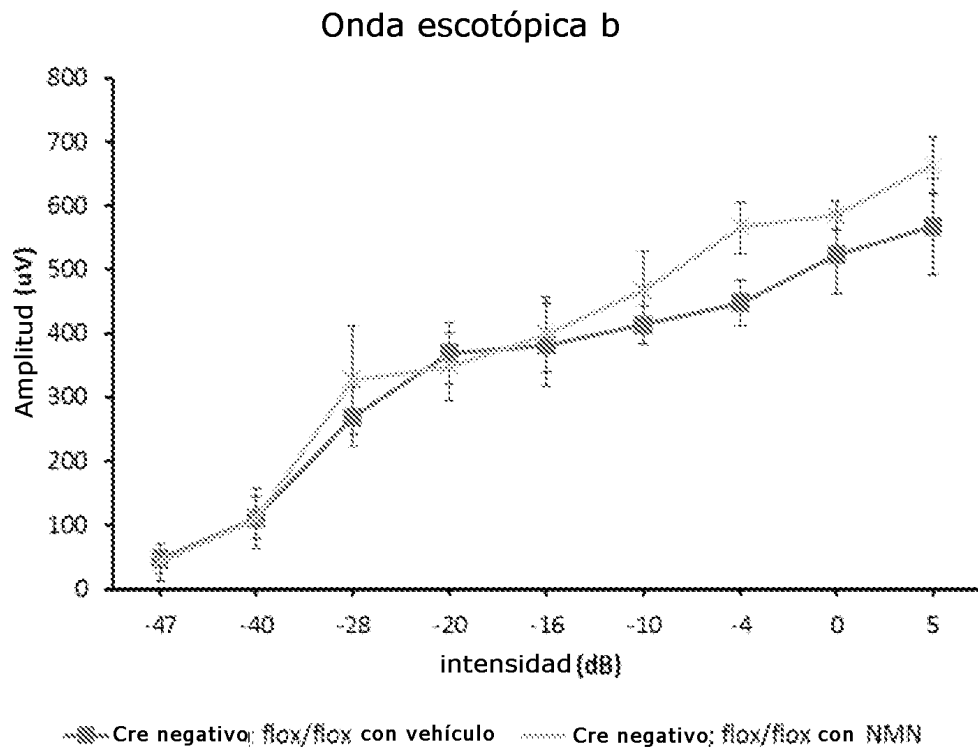
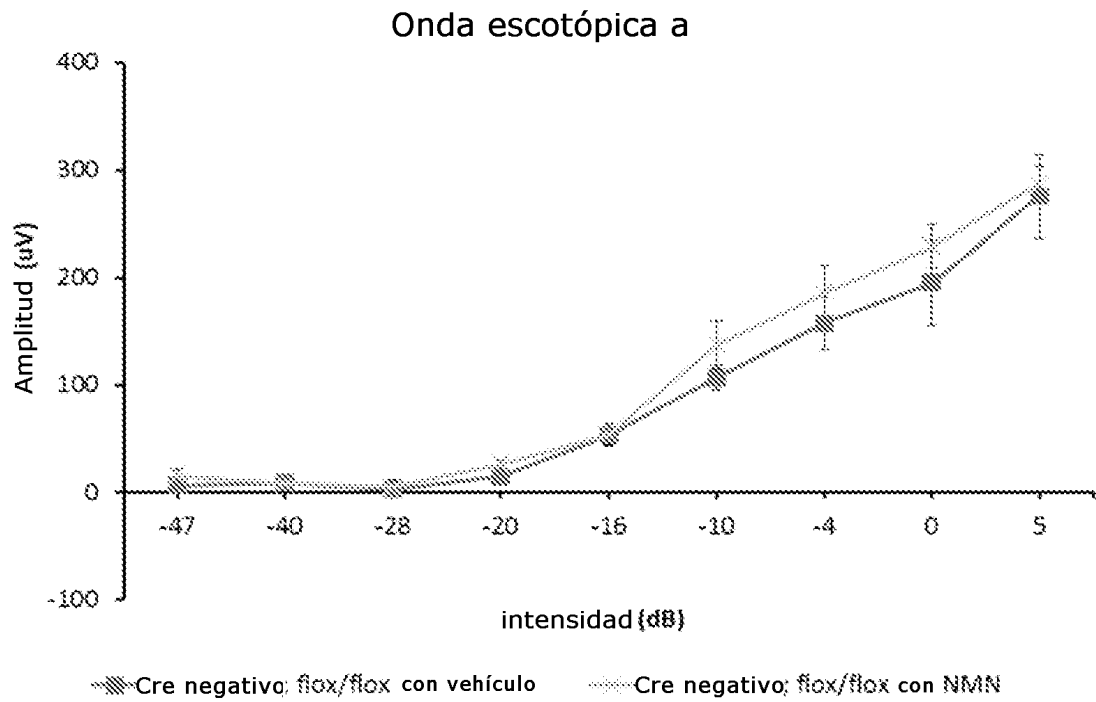


FIG. 34 continuación

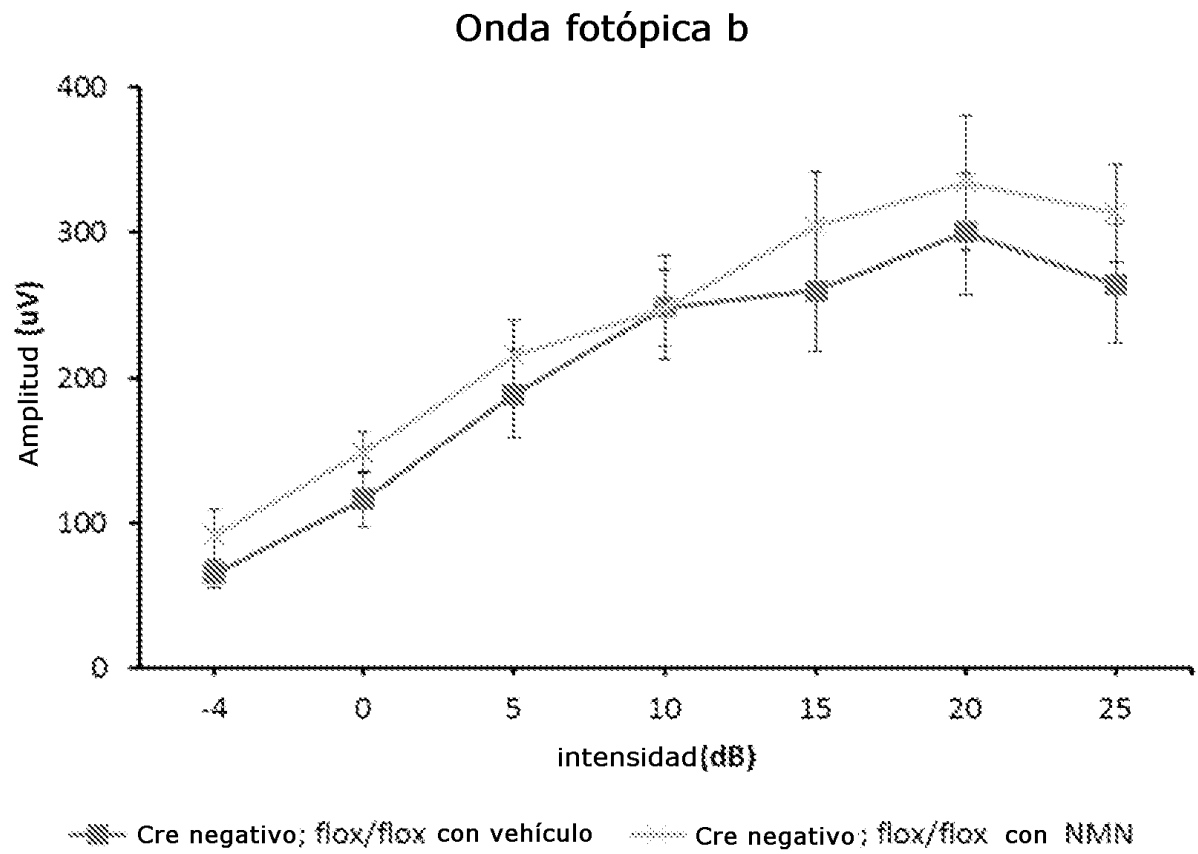


FIG. 35

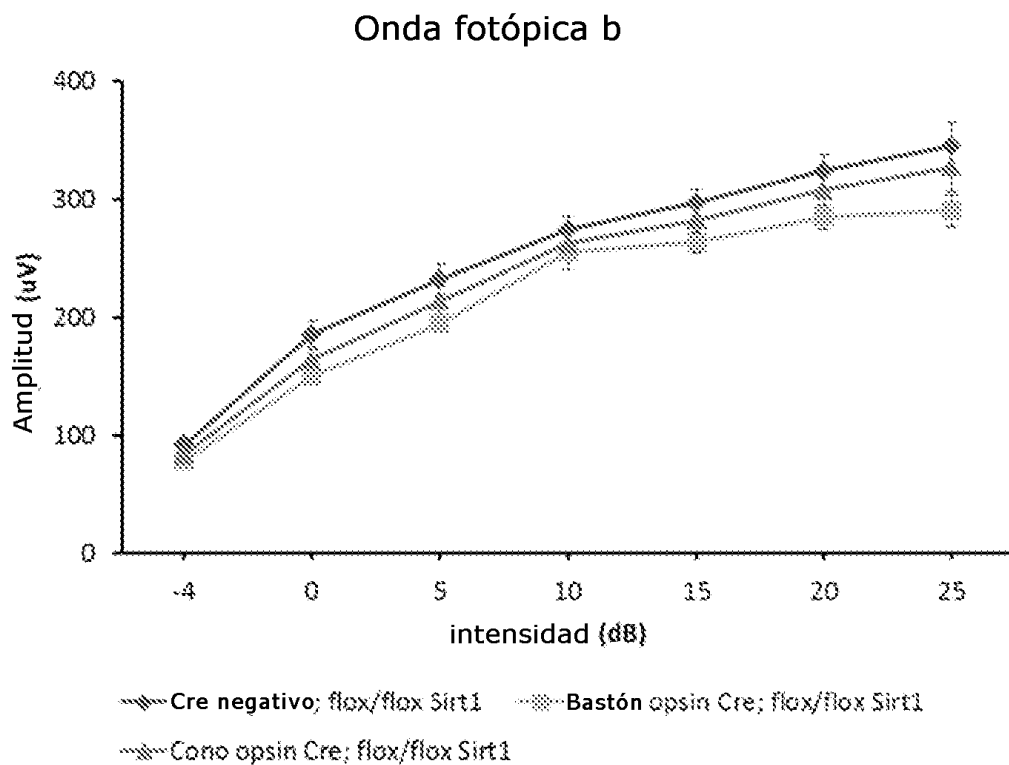
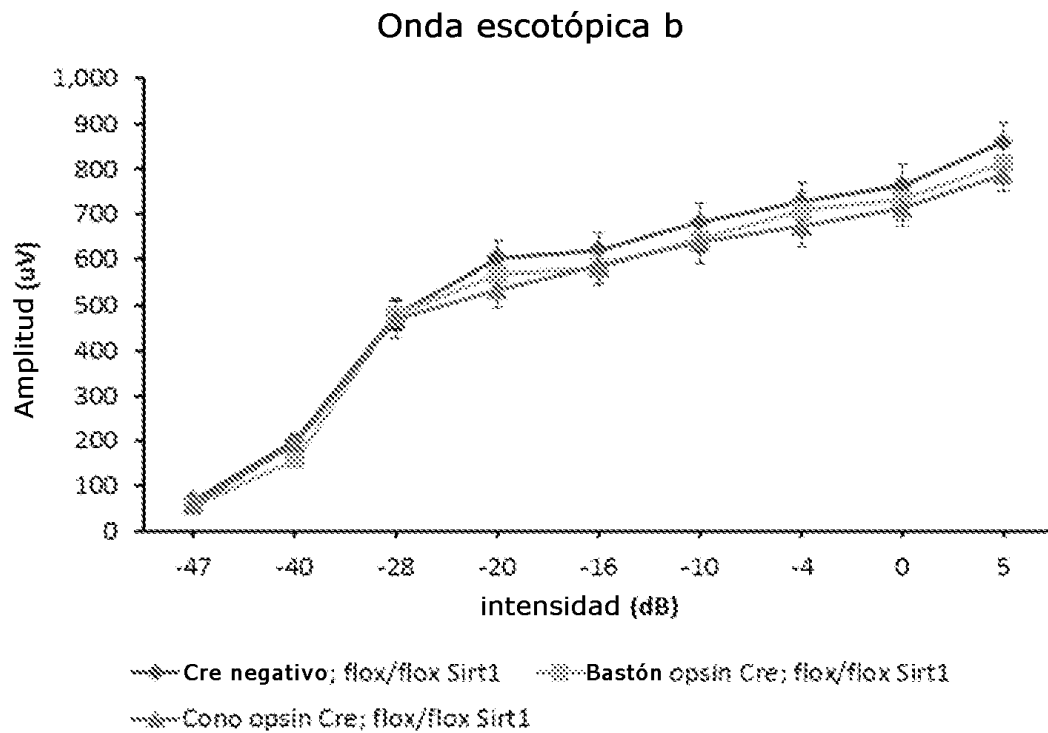


FIG. 35 continuación

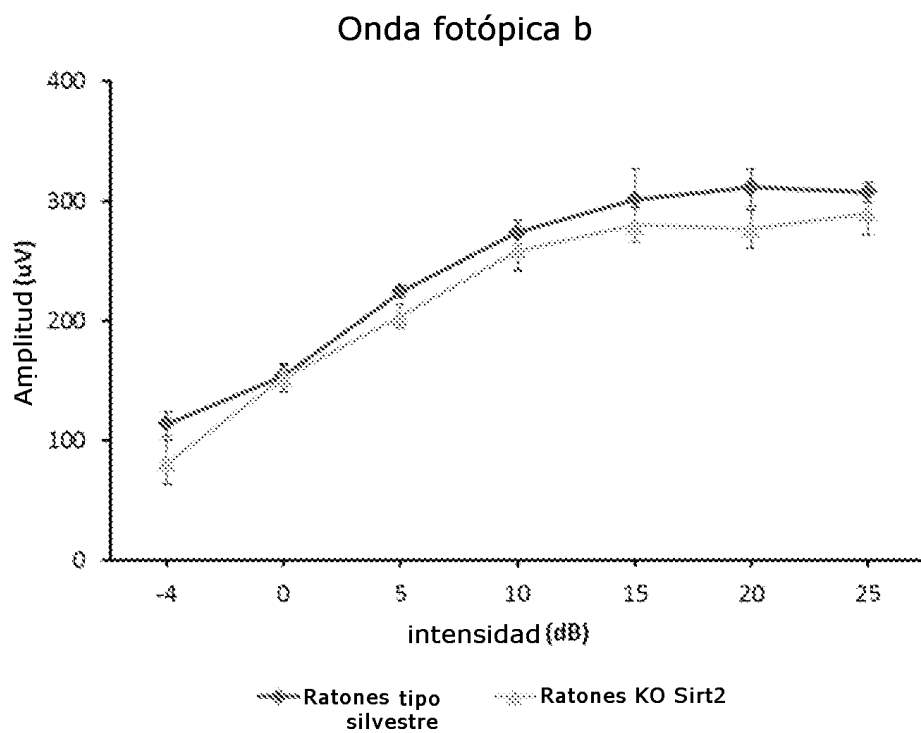
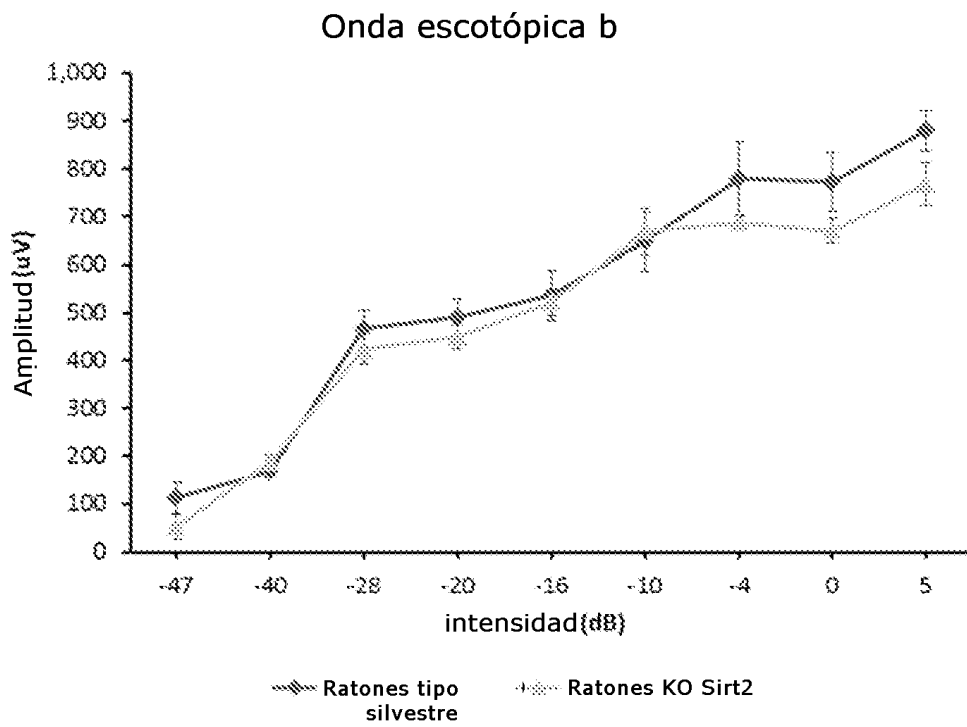


FIG. 35 continuación

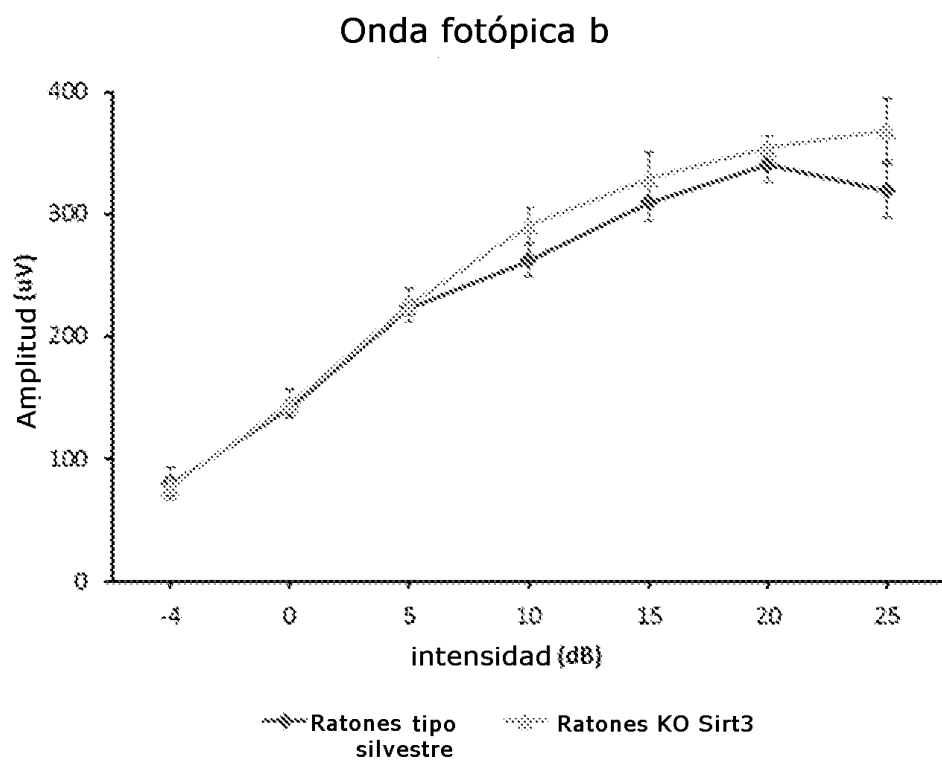
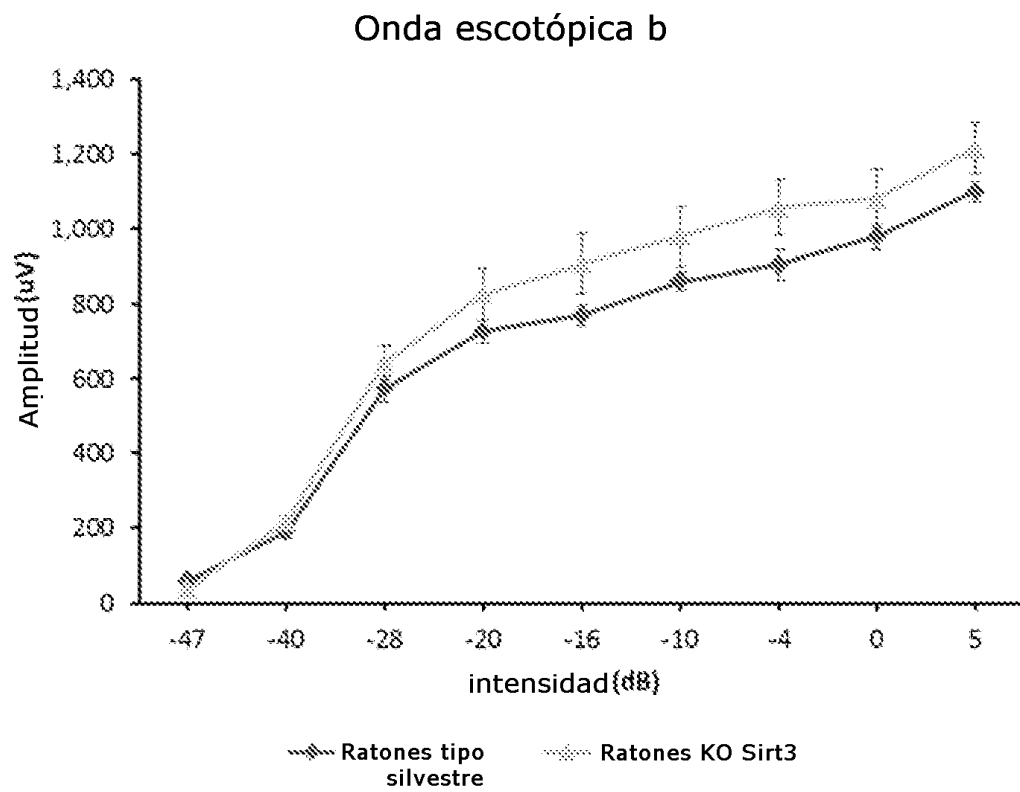


FIG. 35 continuación

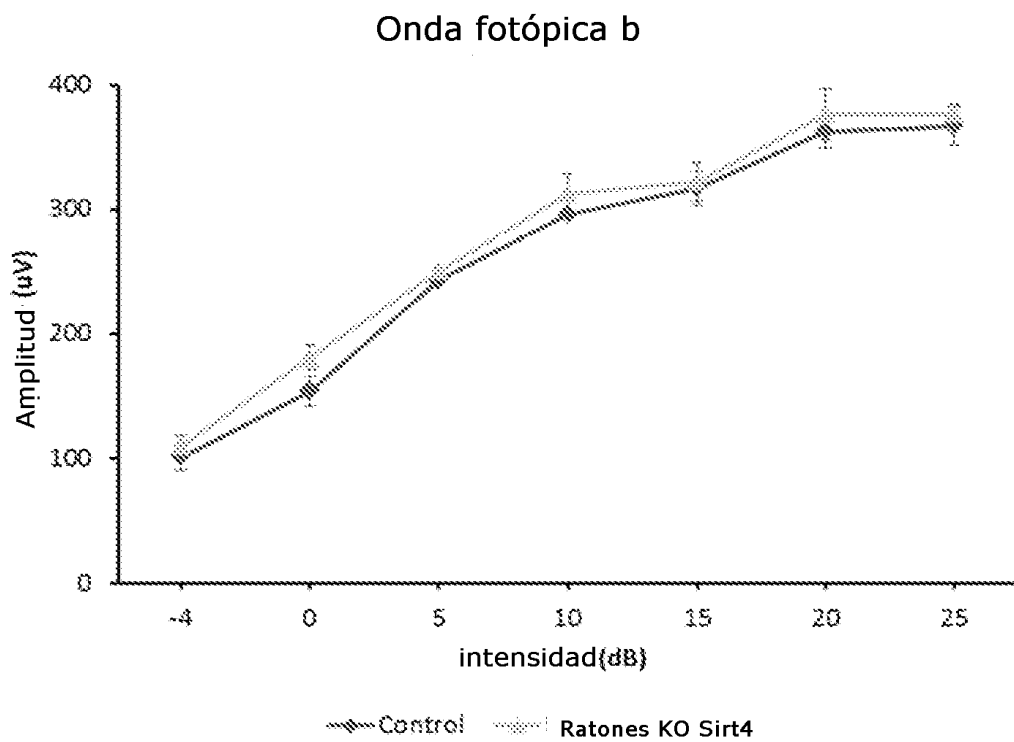
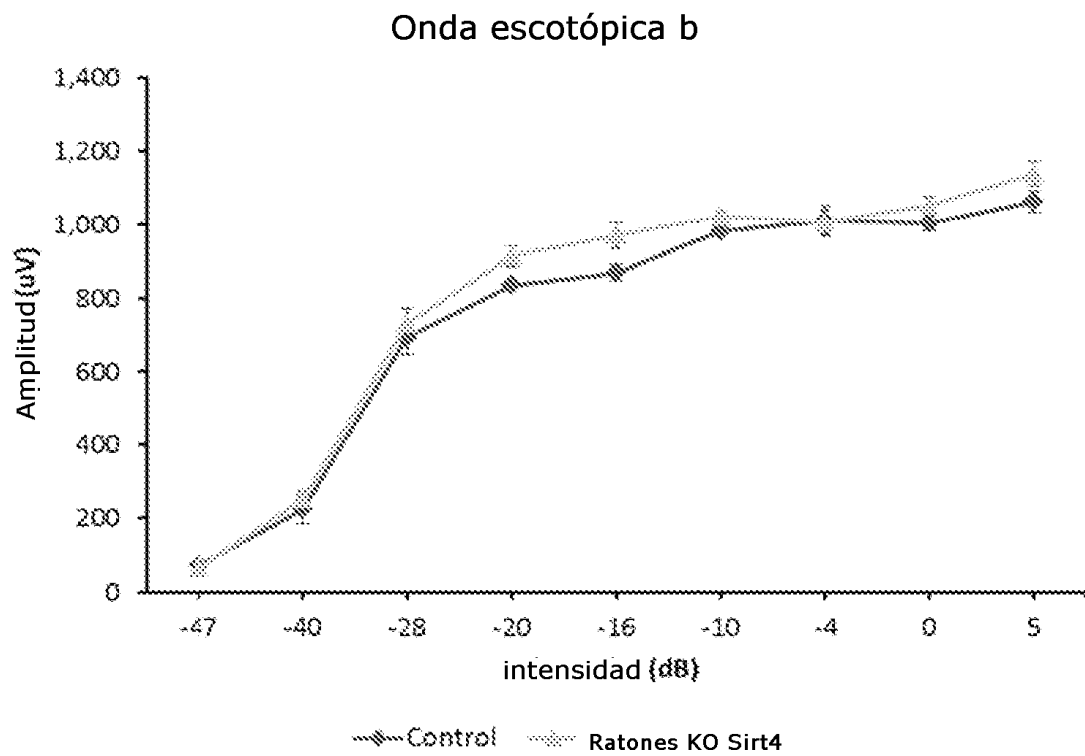


FIG. 35 continuación

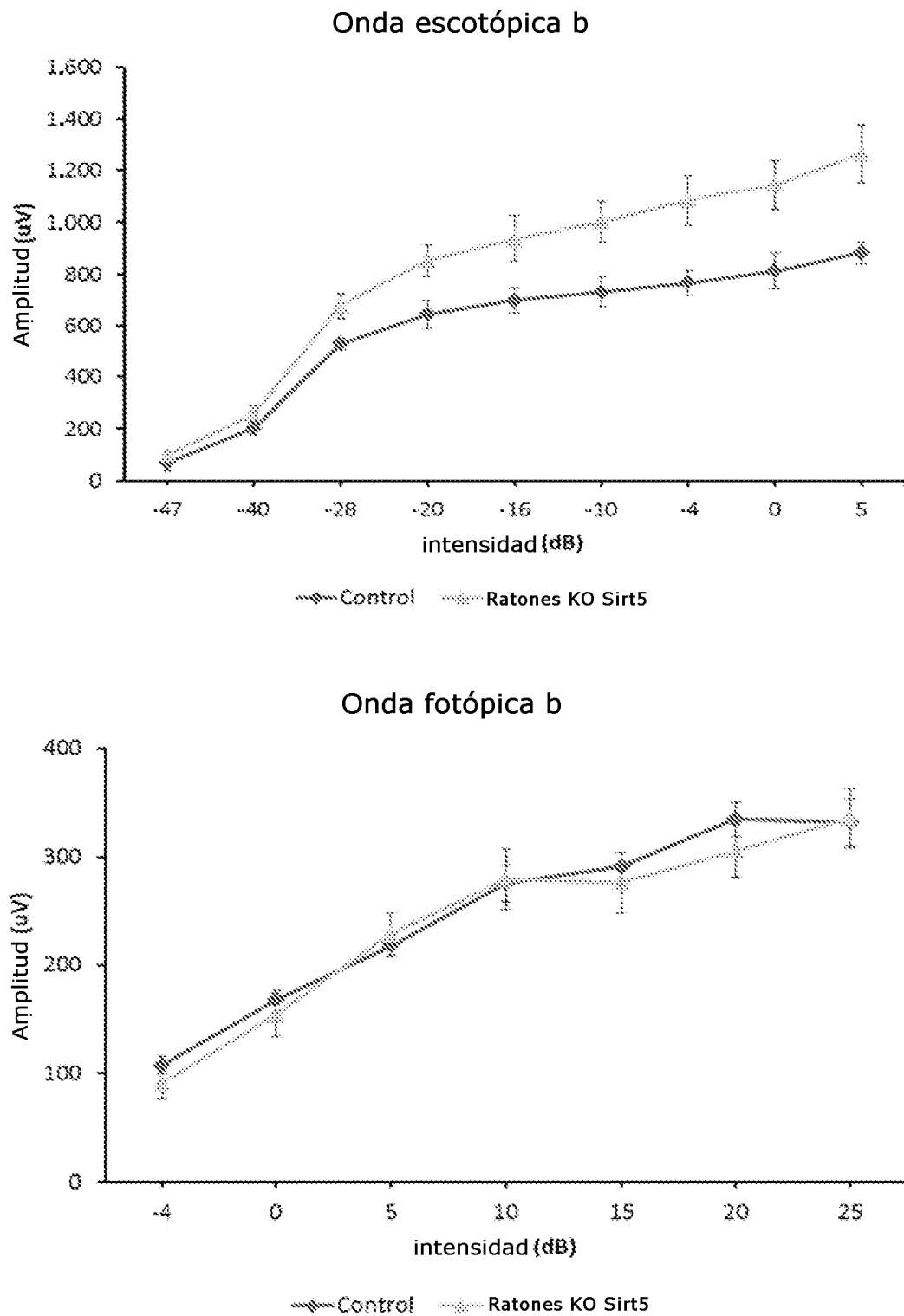
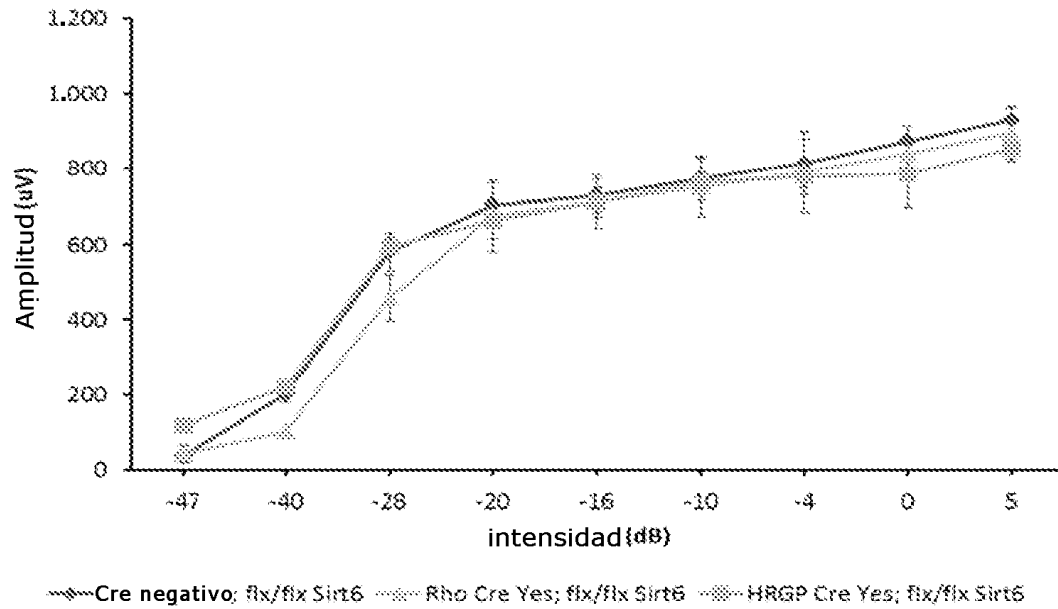


FIG. 35 continuación

Onda escotópica b



Onda fotópica b

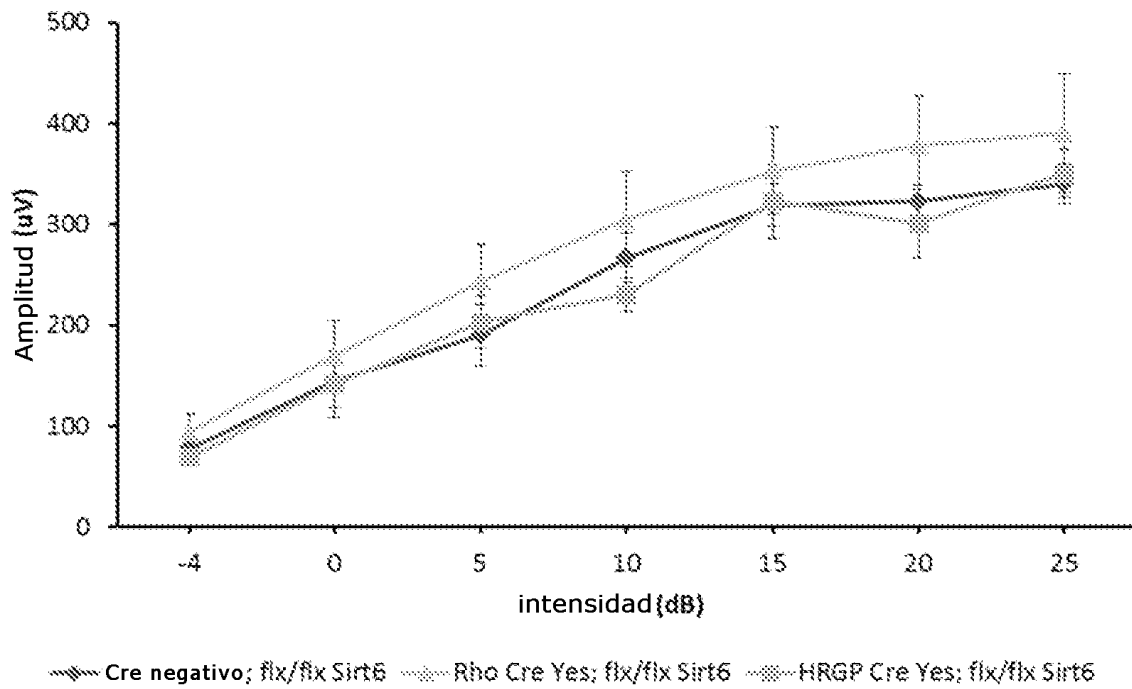


FIG. 36

