



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO:  
RELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES  
METABÓLICAS Y LOS PROCESOS  
DEGENERATIVOS: NAD<sup>+</sup>**

Autor: Elena Calderón Díaz

Fecha: Junio 2020

Tutor: Ángel Agis Torres

## **1. RESUMEN**

El dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $\text{NAD}^+$ ) es una molécula clave para multitud de procesos celulares. Interviene como coenzima en el metabolismo redox, y como cosustrato para las enzimas PARP, SIRT y CD38, las cuales participan en la homeostasis celular, el mantenimiento del material genético, el control de la transcripción, la generación de segundos mensajeros, la regulación de los ritmos circadianos y la longevidad.

Los niveles de este dinucleótido, varían en respuesta a diferentes factores como son el ejercicio y la dieta. Esto conlleva a que, tanto en las alteraciones metabólicas como en el envejecimiento, se vean alterados. Actualmente, las investigaciones se centran en esclarecer los mecanismos por los cuales estos niveles cambian, y parecen estar mediados por una reducción de la síntesis de  $\text{NAD}^+$ , y/o un incremento de la degradación. Las terapias para restaurar estos niveles supondrían una posible prevención o tratamiento de los trastornos metabólicos y los procesos degenerativos, lo que supone un aumento de la vida útil.

Palabras clave:  $\text{NAD}^+$ , NADH, metabolismo, alteración metabólica, disfunción mitocondrial, degeneración, proceso degenerativo, envejecimiento, PARP, CD38, SIRT.

## **2. INTRODUCCIÓN**

Se denomina metabolismo al conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo, a lo largo de toda su vida, para biosintetizar o biodegradar moléculas, y transformar la energía (1). El metabolismo sufre alteraciones consideradas fisiológicas a lo largo del tiempo para ajustarse a las diferentes etapas de la vida de un ser vivo, ya que está regulado por un sistema reloj (ritmos biológicos). Una de estas etapas en las que el metabolismo cambia es el envejecimiento (2).

El envejecimiento es un proceso fisiológico que ocurre en todos los seres vivos, consiste en un deterioro progresivo y continuo de sus funciones, incluido el metabolismo, y finaliza únicamente con la muerte del individuo. En la vejez, se encuentra reducida la capacidad del organismo para mantener la homeostasis celular, lo que provoca daños acumulados en el ADN, las proteínas, las membranas y los orgánulos celulares, incluidas las mitocondrias (3). Múltiples teorías y estudios, intentan explicar el envejecimiento, aunque aún queda mucho por esclarecer. No se ha hallado un mecanismo claro que explique la relación por la que los trastornos degenerativos son una parte inherente al envejecimiento. Encontrar esta explicación permitiría la búsqueda de una solución para vivir más y mejor (4).

Una alteración metabólica implica la disfunción de una o más vías bioquímicas que forman parte de algún proceso fisiológico normal del organismo, y conduce a acumulación de los sustratos iniciales, deficiencia de los productos finales o desarrollo de rutas metabólicas alternativas (5).

Un punto de unión entre las alteraciones metabólicas y los procesos degenerativos que caracterizan al envejecimiento, se encuentra en la molécula  $\text{NAD}^+$ .  $\text{NAD}^+$  es el dinucleótido de nicotinamida y adenina, una coenzima y cosustrato con múltiples funciones. Participa en el metabolismo como molécula transportadora de electrones en reacciones de óxido-reducción, actúa como indicador del estado energético celular, y es también sustrato de numerosas enzimas involucradas en muy diferentes procesos, entre ellas enzimas relacionadas con el envejecimiento (6). Los niveles de  $\text{NAD}^+$  disminuyen en las alteraciones metabólicas y durante el deterioro fisiológico, a través de cambios en las reacciones implicadas en su síntesis y degradación. Debido a su participación tanto en el metabolismo energético como en el envejecimiento, un cambio en estos niveles afectaría a ambos procesos (4).

### 3. OBJETIVOS

En este trabajo se pretende realizar una revisión bibliográfica para conocer algunos aspectos sobre NAD<sup>+</sup>:

- Cuál es su estructura
- En qué procesos está implicado
- Cómo es su metabolismo y cómo puede variar con respecto al envejecimiento y a las alteraciones metabólicas
- Qué posibles mecanismos explican la disfunción de su metabolismo
- Qué terapias solventarían esta disfunción

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica online de artículos de revistas científicas y libros, en PubMed, catálogo Cisne de la Biblioteca Complutense de Madrid, Web of Science (FECYT), Science Direct, y Elsevier, entre otras.

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. EL DINUCLEÓTIDO DE NICOTINAMIDA Y ADENINA (NAD<sup>+</sup>)

##### Estructura y funciones

El dinucleótido de nicotinamida y adenina, NAD<sup>+</sup>, del inglés nicotinamide adenine dinucleotide, es una molécula formada por dos nucleótidos unidos mediante sus dos grupos fosfato. Uno de los nucleótidos está formado por ribosa y nicotinamida, y el otro por ribosa y adenina (Figura 1 (7)). Su estructura química deriva de la niacina (vitamina B3), la cual proviene del triptófano. La carencia de niacina origina la pelagra, una enfermedad caracterizada por producir diarrea, dermatitis y demencia (8-10).

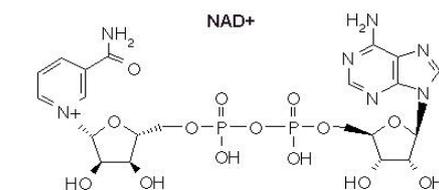


Figura 1. Estructura química de NAD<sup>+</sup> (7)

NAD<sup>+</sup> es una molécula que se halla en todas las células vivas e interviene en múltiples funciones, tanto como coenzima, como cosustrato. La importancia de NAD<sup>+</sup> ha ido aumentando con el tiempo. Antes, se le consideraba importante principalmente por su función como coenzima en reacciones de óxido-reducción, como molécula transportadora de electrones para los procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, la glicólisis, la β-oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa. NAD<sup>+</sup>, actúa como indicador del estado energético celular, sus niveles aumentan en respuesta a ejercicio, ayuno y restricción calórica, convirtiéndole en una molécula clave para la modulación del metabolismo ante estos estímulos (6).

Actualmente, su importancia se ha expandido más allá de ser un intermedio clave en el metabolismo; se le considera un regulador esencial en múltiples vías de señalización celular (6, 11). Es sustrato de tres familias distintas de enzimas: poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARP), ADP-ribosil ciclasas (CD38 / CD157) y sirtuinas (SIRT) (3). Las enzimas miembros de las familias PARP y SIRT requieren NAD<sup>+</sup> para mantener la integridad genómica, la mejora de la eficiencia metabólica, la biogénesis mitocondrial y la extensión de la vida útil (12). CD38 lo usa para la generación de segundos mensajeros. Además de los ya mencionados, estas enzimas hacen a NAD<sup>+</sup> partícipe de procesos tan importantes como la reparación del ADN, el mantenimiento de la cromatina, y las modificaciones epigenéticas (13). Otros procesos en los que interviene, abarcan la división celular, la inflamación y la respuesta inmunitaria, y el control de la ritmicidad circadiana. Con el reloj biológico forma un bucle. Este regula la síntesis de NAD<sup>+</sup>, y a su vez, las concentraciones de NAD<sup>+</sup> regulan la actividad del reloj (2).

Por su amplia intervención en múltiples procesos, relacionados tanto con las disfunciones del metabolismo como con el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad, su estudio resulta crucial (11).

### Papel como transportador de electrones y formas redox.

Los nucleótidos de nicotinamida,  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , actúan como transportadores de electrones. Tanto  $\text{NAD}^+$  como  $\text{NADP}^+$  actúan como coenzimas para reacciones de óxido-reducción catalizadas por deshidrogenasas en las que se eliminan dos átomos de hidrógeno de un sustrato oxidable, captando las coenzimas, en el anillo de nicotinamida, un ion hidruro (dos electrones y un protón) a partir del sustrato oxidable (8, 10, 14).  $\text{NADP}^+$  es el fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina, es un análogo próximo de  $\text{NAD}^+$ , tiene su misma estructura, pero con un grupo fosfato adicional esterificado al azúcar del nucleótido de adenina (8, 10).

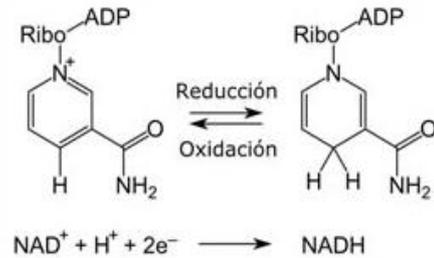


Figura 2.  $\text{NAD}^+$  (forma oxidada) y  $\text{NADH}$  (forma reducida) (9)

Las funciones metabólicas de  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  demandan que sufran reducción reversible, de forma tal que puedan aceptar electrones, transformarse en sus formas reducidas  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$ , pasarlos a otros transportadores y ser regenerados a sus formas oxidadas para seguir participando en reacciones de oxidación-reducción (14) (Figura 2 (9)).

### Papel en el metabolismo redox

Tanto  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , como  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$ , desempeñan funciones como intermediarios metabólicos (10). Juegan un papel clave en la regulación de la producción de energía y el metabolismo (15).  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  tienen la misma función actuar como transportadores de electrones, sin embargo, su distinción, es que llevan a cabo esta función en diferentes puntos del metabolismo: el  $\text{NAD}^+$  ayuda a catalizar las reacciones implicadas en el catabolismo aceptando electrones de las moléculas que se oxidan, mientras que la forma reducida del  $\text{NADP}^+$ , el  $\text{NADPH}$  actúa en las reacciones anabólicas donando los electrones a las moléculas que se van a sintetizar. En la célula la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  es muy alta y por el contrario  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  es muy baja. De esta forma está garantizada la disponibilidad de  $\text{NAD}^+$  para las vías catabólicas y la de  $\text{NADPH}$  para las anabólicas. Es debido a esto, que entre las demás formas de los nucleótidos de adenina,  $\text{NAD}^+$  es el intermediario metabólico por excelencia en la producción de energía, y en el mantenimiento de la función celular (10). La cantidad citosólica y mitocondrial de  $\text{NAD}^+$  modula la actividad de las vías metabólicas específicas de los compartimentos.  $\text{NAD}^+$  interviene, entre otros, en la glucólisis, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Gracias a  $\text{NAD}^+$ , se produce trifosfato de adenosina (ATP) (6, 12).

### Estado redox

La proporción  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  es un indicador del estado energético celular (estado redox). En condiciones de hipoxia, el  $\text{NADH}$  se acumula, ya que menos cantidad de  $\text{NADH}$  es oxidado a  $\text{NAD}^+$ . Como el estado redox de la mitocondria refleja el estado energético celular, el cociente  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  se considera un indicador directo de producción de ATP en las células y puede medirse a través de espectrofotometría fluorescente debido a que  $\text{NADH}$  (pero no  $\text{NAD}^+$ ), emite una fluorescencia azul cuando es iluminado con luz ultravioleta. Así la medición de la fluorescencia del  $\text{NADH}$  mitocondrial puede utilizarse como una medición directa del estado bioenergético tisular (16). Los cambios en la proporción  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  en la célula, controlan el sentido de vías metabólicas y la actividad sus enzimas (9).

## **Niveles celulares de NAD<sup>+</sup>**

NAD<sup>+</sup> es muy abundante en el cuerpo humano. Está presente en unos tres gramos por persona (13). Un estudio observó que la concentración intracelular de NAD<sup>+</sup> puede ser de hasta 800 mM en levadura, 100-400 mM en un modelo in vitro de células humanas, y aproximadamente 0.2 mmol/kg en músculo de ratón (11). Este dinucleótido no solo se halla en el citoplasma, sino también dentro de los principales orgánulos, incluidos el núcleo, la mitocondria, el aparato de Golgi y los peroxisomas. Estos compartimentos no tienen niveles equitativos de NAD<sup>+</sup> (13). Se cree que la compartimentación subcelular de NAD<sup>+</sup> juega un papel crítico en la regulación del metabolismo. A medida que disminuyen los niveles totales de NAD<sup>+</sup>, los distintos depósitos subcelulares pueden influir en qué procesos bioquímicos dependientes del consumo de NAD<sup>+</sup> se producen, y por lo tanto afectará a las otras vías metabólicas que de él dependan. Se ha cuantificado que en la mitocondria, la concentración de NAD<sup>+</sup> siempre es mayor que en los demás compartimentos, incluido el citosólico, para mantener una función redox óptima (17). Esto se consigue porque las reservas nucleares y citoplasmáticas de NAD<sup>+</sup> son intercambiables, mientras que las mitocondriales están relativamente aisladas. Consecuentemente, los tejidos metabólicamente más activos, presentan mayores concentraciones del dinucleótido. Se están desarrollando nuevas técnicas para poder medir los niveles de NAD<sup>+</sup>. Biosensores fluorescentes codificados genéticamente, como SoNar y un biosensor con un dominio de unión a NAD<sup>+</sup>, permiten obtener imágenes de los niveles relativos de NAD<sup>+</sup> en los compartimentos (11). Con respecto a su cuantificación extracelular, recientemente, en un estudio se determinó la presencia de metabolitos NAD<sup>+</sup> en muestras humanas clínicamente relevantes, como plasma, líquido cefalorraquídeo y eritrocitos. Además, también incluyeron músculo esquelético de primates. Por primera vez se hallaron los metabolitos de NAD<sup>+</sup> en el líquido cefalorraquídeo humano (18). Avances recientes en métodos de rastreo de alta resolución y alta sensibilidad para los metabolitos de NAD<sup>+</sup>, como mitoPARP, PARAPLAY y Apollo-NADP<sup>+</sup> revelaron que la concentración y distribución de NAD<sup>+</sup> y sus metabolitos cambian en respuesta a diferentes factores (13).

El ejercicio y el tipo de dieta pueden modificar la concentración de NAD<sup>+</sup> en varios tejidos. Multitud de estudios han demostrado que se puede cambiar la concentración de NAD<sup>+</sup> con un aumento de ejercicio de intensidad moderada, tanto en ratones como en humanos. Además, mientras que una ingesta diaria contundente en grasas disminuye el NAD<sup>+</sup>, el ejercicio y la restricción calórica pueden aumentar el NAD<sup>+</sup> en el músculo e hígado de ratones obesos y de edad avanzada. Se demostró que 6 semanas de ejercicio mejoran la tolerancia a la glucosa y aumentan el NAD<sup>+</sup> muscular en un modelo de ratón de obesidad inducida por una dieta alta en grasas (HFD) (11). También se está estudiando cómo cambian los niveles de NAD<sup>+</sup> tanto en el día a día (oscilaciones circadianas), como con la edad. Estudios en ratones y humanos, están demostrando que la edad es un factor decisivo en los niveles de NAD<sup>+</sup> circulantes.

Por lo tanto, los niveles de NAD<sup>+</sup> además de estar regulados por muchas actividades celulares como el metabolismo redox, la transcripción, y la señalización, también pueden verse significativamente influenciados por el ejercicio, la dieta, el estado metabólico, la edad y otras facetas de la salud relevantes (11). Los mecanismos por los cuales estos factores varían las concentraciones de NAD<sup>+</sup>, se deben a modificaciones en la síntesis y degradación del dinucleótido.

## **5.2. EL METABOLISMO DE NAD<sup>+</sup>**

En las reacciones redox, el cambio entre las formas oxidadas (NAD<sup>+</sup>) y reducidas (NADH), no reduce los niveles generales del dinucleótido ya que es un proceso reversible, sin embargo, en nuestro organismo hay una elevada exigencia de NAD<sup>+</sup>. Esto se debe al constante consumo de la coenzima por las enzimas que la usan como sustrato y la degradan. NAD<sup>+</sup> se encuentra

constantemente sintetizándose, degradándose y reciclándose (13). Por ello, es imprescindible una correcta armonía entre su síntesis, su degradación y su reciclaje, para que los niveles de  $\text{NAD}^+$  se mantengan estables (19).

### **Biosíntesis de $\text{NAD}^+$**

La síntesis de  $\text{NAD}^+$  abarca la vía de novo, la vía de Preiss-Handler y vía de rescate (vía de recuperación de los precursores), con algunas diferencias entre los organismos inferiores y los mamíferos (20). En mamíferos,  $\text{NAD}^+$  se puede sintetizar desde triptófano por la vía de novo, de ácido nicotínico (NA) por la vía de Preiss-Handler, y de nicotinamida (NAM) y de ribósido de nicotinamida (NR) por la vía de rescate (20) (Figura 3 (21)).

La **vía de novo** convierte el aminoácido triptófano de la dieta en ácido quinolínico (QA) a través de múltiples pasos enzimáticos en la ruta de la kinurenina (13, 19), para sintetizar el mononucleótido de ácido nicotínico (NaMN) (19). La **vía Preiss-Handler** comienza con NA convirtiéndose a NaMN a través de la enzima ácido fosforibosiltransferasa de ácido nicotínico (NAPRT). Un reciente trabajo en células de mamíferos ha demostrado que otro metabolito, el ribósido de ácido nicotínico (NaR) puede incorporarse en la vía de Preiss-Handler, para formar NaMN a través de la nicotinamida ribósido quinasa (NRK) (21). Posteriormente, ambas vías coinciden para seguir un camino común: NaMN se convierte en dinucleótido de adenina de ácido nicotínico (NaAD) a través del conjunto de enzimas mononucleótido de nicotinamida adeniltransferasa (NMNAT).

Finalmente,  $\text{NAD}^+$  se amida mediante la  $\text{NAD}^+$  sintasa (19, 21). La **vía de rescate** es la principal en mamíferos para la biosíntesis de  $\text{NAD}^+$ . La nicotinamida (NAM) se convierte en NMN, mediante la nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT), que es la enzima limitante de la velocidad en esta vía. NAMPT juega un papel crítico en la regulación de los niveles celulares de  $\text{NAD}^+$ . NMN se convierte inmediatamente en  $\text{NAD}^+$  por las adeniltransferasas de NMN (NMNAT) (19). NR necesita convertirse en NMN mediante nicotinamida ribosa quinasa (NRK), concretamente NRK1 y NRK2, que fosforilan NR (6, 19). Múltiples enzimas rompen  $\text{NAD}^+$  en NAM y ADP-ribosa, y se recupera la NAM (20). Una parte de la NAM resultante se convierte en 1-metilnicotinamida por la enzima nicotinamida-N-metiltransferasa (NNMT), para su excreción vía renal (20, 22). La vía de recuperación se da en varios compartimentos celulares, incluidos el núcleo y las mitocondrias. Los precursores se encuentran en el medio extracelular y pasan a través de la membrana plasmática al interior de la célula, donde se utilizan (13). La utilización de una vía u otra depende del tejido, ya que dependen de la expresión de las enzimas marcapaso en los diferentes tejidos (6). Mientras la síntesis de novo se da en la placenta, el pulmón y en células del sistema inmune en respuesta a estímulos inflamatorios, la vía de rescate opera en la mayoría de los tejidos, siendo la principal fuente de  $\text{NAD}^+$  de la célula (6).

El mantenimiento de una correcta biosíntesis de  $\text{NAD}^+$  es primordial para la supervivencia y la función celular. El descarrilamiento de la homeostasis normal de  $\text{NAD}^+$  afecta no solo al conjunto de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  requerido para las reacciones redox, sino también a las actividades de las enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$  para funciones celulares cruciales (19).

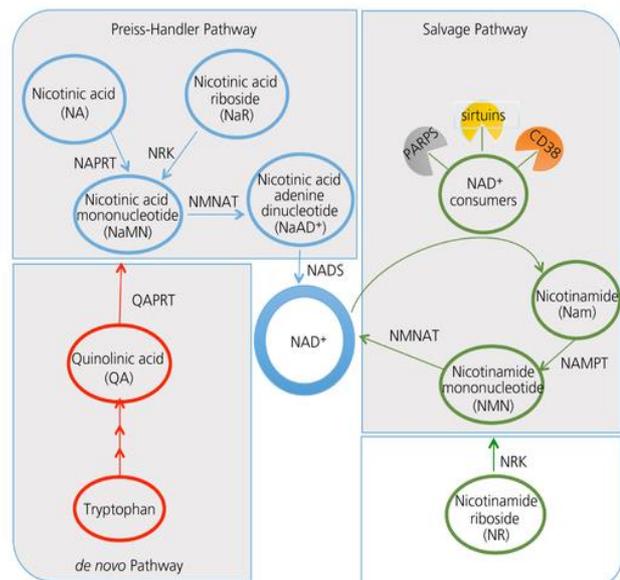


Figura 3. Metabolismo de  $\text{NAD}^+$ : Rutas biosintéticas (21)

## Degradación: Enzimas consumidoras de NAD<sup>+</sup>

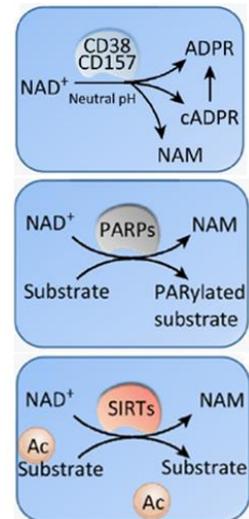
Las enzimas de las reacciones redox no consumen NAD<sup>+</sup>, solo lo catalizan su oxidación y reducción reversible. En contraste, las enzimas consumidoras de NAD<sup>+</sup>, lo usan como cosustrato y conducen a su degradación (3). Intervienen en diferentes de procesos de señalización para la regulación de prácticamente todas las actividades celulares, y a causa de ello, NAD<sup>+</sup> se degrada en grandes cantidades (22).

En mamíferos, tres familias distintas de enzimas consumen NAD<sup>+</sup> como sustrato (Figura 4 (11)): polimerasas de poli (ADP-ribosa) (PARP), ADP-ribosil ciclasas (cADPRS) y sirtuinas (SIRT)(3). El consumo, implican la escisión de NAD<sup>+</sup> en el enlace glucosídico entre la NAM y la ADP-ribosa (20). Estas enzimas usan la ADP-ribosa en sus mecanismos de acción y la NAM se libera para ser incorporada a la vía de rescate para la biosíntesis de NAD<sup>+</sup>.

La enzima NNMT que metila NAM, utilizando S-adenosil metionina (SAM) como donante de grupos metilo, esto saca a NAM del reciclaje, por lo que afecta los niveles de NAD<sup>+</sup> de forma indirecta (11).

Figura 4. Mecanismo de acción de las enzimas que degradan NAD<sup>+</sup> (11)

Las **ADP-ribosa sintasas cíclicas (cADPRS) CD38 y CD157**, hidrolizan NAD<sup>+</sup> a NAM, y producen ADP-ribosa cíclica; Además, CD38 puede degradar NMN a NAM, eliminando NMN de la síntesis de NAD<sup>+</sup>. (3, 11, 20). Las **polimerasas de poli (ADP-ribosa) (PARP)**, especialmente **PARP1 y PARP2**, usan NAD<sup>+</sup> como co-sustrato para catalizar la adición de ADP-ribosa a una proteína aceptora para formar polímeros de poli (ADP-ribosa), con extensión y ramificación de la cadena, y generando NAM como un subproducto (3, 11, 20). Las **sirtuinas (SIRT)** son desacetilasas. Escinden NAD<sup>+</sup> para catalizar la eliminación de grupos acetilo o acilo de las lisinas de las proteínas sustrato de las sirtuinas, tras la hidrólisis del enlace amida, transfiriendo el grupo acetilo a la ribosa del NAD<sup>+</sup> (20), generando como subproductos: sustrato con lisina desacetilada, NAM, y 2'-O-acetil-ADP-ribosa (3, 11, 20).



El uso de NAD<sup>+</sup> por parte de estas enzimas conlleva que se puedan llevar a cabo multitud de funciones imprescindibles para nuestro organismo:

### I. ADP ribosil ciclasas (cADPRS): CD38 y CD157

Esta familia de enzimas, está formada por CD38 y CD157. Son glicoproteínas transmembrana, localizadas tanto en la membrana plasmática como las membranas de los orgánulos intracelulares, incluidas las mitocondrias, el núcleo y el retículo endoplasmático (11). Se encuentran distribuidas en varios tipos celulares, incluyendo casi todas las células del sistema inmune, y está altamente expresado en neuronas y astrocitos. Aparece en tejidos como el cerebro, músculo cardíaco, hígado y páncreas (3, 23). Son enzimas multifuncionales (24). Desempeñan un papel clave en varios procesos fisiológicos como la respuesta inmune, la inflamación, el cáncer y las enfermedades metabólicas (3, 25). Catalizan la producción de varios segundos mensajeros, como cADPR. Por su función como cADPRS, catalizan la ciclación de la ADP-ribosa. Los segundos mensajeros actúan en multitud de procesos, como por ejemplo, la movilización de calcio intracelular (3). Es en su dominio extracelular, donde las cADPRS funcionan como NADasas, hidrolizando NAD<sup>+</sup> a NAM (11).

De las dos cADPRS, CD38 es la más importante ya que su principal actividad enzimática es la hidrólisis de NAD<sup>+</sup> en los tejidos de mamíferos (3, 25, 26), y degrada gran parte del NAD<sup>+</sup> total. (11, 27). Además, metaboliza el precursor de NAD<sup>+</sup>, NMN *in vivo*, lo que también afecta a los niveles de NAD<sup>+</sup> (11). Al estar presente tanto en la membrana externa como en las internas, podría ser un regulador de los grupos intracelulares de NAD<sup>+</sup>, y por tanto, de las vías metabólicas (3).

CD157 también produce cADPR, sin embargo, su capacidad para degradar el NAD<sup>+</sup> es más baja, y sus funciones quedan más vinculadas a la respuesta inmune (3).

## II. Polimerasas de poli (ADP-ribosa): PARP

En humanos, las proteínas PARP son un conjunto de 17 enzimas localizadas en todos los tejidos. PARP1 y PARP2 representan la mayoría de la actividad basal de PARP en la célula (3). Las PARP hidrolizan  $\text{NAD}^+$  y transfieren el resto ADP-ribosa a la cadena lateral de un aminoácido de una proteína que se pretende modificar (15). Cuando las PARP transfieren múltiples restos ADP-ribosa a una proteína, conducen a la formación de polímeros de poli (ADP-ribosa) (3). Con ello, se dice que las PARP, “poli ADP-ribosilán” proteínas (15). La poli ADP ribosilación es una importante modificación postraduccional de proteínas que afecta la reparación del ADN y la regulación epigenética (11). Por lo tanto, las PARP al consumir  $\text{NAD}^+$ , dirigen la reparación del daño del ADN, controlan la estructura de la cromatina, y realizan modificaciones epigenéticas para modular a la expresión de genes (15). Por consiguiente, intervienen en la tumorigénesis, la diferenciación celular, el metabolismo, la neurodegeneración, y el envejecimiento (3, 11).

La activación de PARP1 es una parte integral de la respuesta celular al daño del ADN inducido por el estrés oxidativo. La sobreactivación de PARP1 conduce a una disminución catastrófica en el  $\text{NAD}^+$  citosólico, lo que lleva a la inhibición glucolítica directa, la disfunción mitocondrial y la muerte celular (3).

## III. Sirtuinas: SIRT

Las sirtuinas son desacetilasas dependientes de  $\text{NAD}^+$  con multitud de funciones: regulan la expresión génica (acción epigenética), y con ello intervienen en la regulación del metabolismo y del envejecimiento, participan en la homeostasis mitocondrial, la resistencia al estrés oxidativo, el mantenimiento del ADN (3, 15), la regeneración celular y la modulación de diferentes enzimas (28), entre otras... Evitando la neurodegeneración, la pérdida de células madre y la disfunción mitocondrial (11), para aumentar la vida útil. Hay siete sirtuinas de mamíferos (SIRT1-7) con localización, actividad enzimática y sustratos diferentes (3). Se aumenta su expresión con restricción de calorías y descende con una dieta alta en grasas y durante la vejez (29). SIRT1 es la más implicada en el metabolismo y en el deterioro fisiológico, seguida de SIRT3 y SIRT6 (30). La proteína SIRT1 induce cambios en una variedad de sustratos y es

una pieza clave para regular el metabolismo energético (2) (Figura 5 (31)). Además de funcionar como un modificador epigenético por su actividad histona desacetilasa, también regula la transcripción mediante la desacetilación de varios factores de transcripción, lo cual la implica en multitud de funciones. La activación de SIRT1, propicia la acción del coactivador gamma del receptor activado por proliferador de peroxisoma 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), y de la proteína de caja de horquilla O1 (FOXO1), lo que produce aumento de la biogénesis mitocondrial, del metabolismo oxidativo y de las vías de defensa antioxidante. La disfunción mitocondrial es una

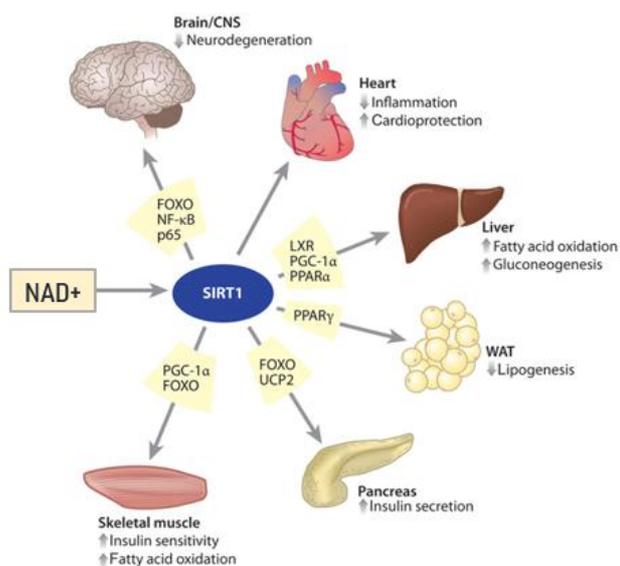


Figura 5. Funciones de SIRT1. La activación de SIRT1 promueve la supervivencia de las neuronas y de los cardiomiocitos. En el hígado, promueve la  $\beta$ -oxidación y la gluconeogénesis durante el ayuno. En el tejido adiposo blanco (WAT), disminuye el acúmulo de triglicéridos al reprimir PPAR $\gamma$ . En páncreas, promueve la secreción de insulina y la supervivencia de las células  $\beta$ -pancreáticas. En el músculo esquelético, promueve la biogénesis mitocondrial (31 modificado).

marca inequívoca tanto para el envejecimiento y las enfermedades asociadas a este, como para las alteraciones metabólicas. La investigación en la modulación de SIRT1 podría ofrecer una alternativa terapéutica en la búsqueda de la mejora de estas enfermedades (2, 29, 30, 32).

Los niveles de NAD<sup>+</sup> oscilan de manera circadiana, vinculándose al reloj biológico por mecanismos epigenéticos a través de SIRT1 (32). Las SIRT regulan los genes implicados en el reloj circadiano, y por tanto influyen sobre el reloj biológico. Además, SIRT1 está implicada en esta regulación en un bucle en el que intervienen los niveles de NAD<sup>+</sup> (Figura 6 (30)): mediante la desacetilación de PGC-1 $\alpha$ , amplifica la expresión de los factores de transcripción circadianos BMAL y CLOCK (20). La vía biosintética de NAD<sup>+</sup> mediada por NAMPT, tiene la característica de que la transcripción del gen NAMPT está mediada por los factores clave de la transcripción circadiana CLOCK / BMAL (30). Recordando que al ser las sirtuinas enzimas dependientes de NAD<sup>+</sup>, los niveles de NAD<sup>+</sup> regulan su actividad (29). Por lo tanto, SIRT1 y NAMPT comprenden un circuito de retroalimentación reguladora circadiana, que produce la oscilación diaria de los niveles de NAD<sup>+</sup> (2, 30).

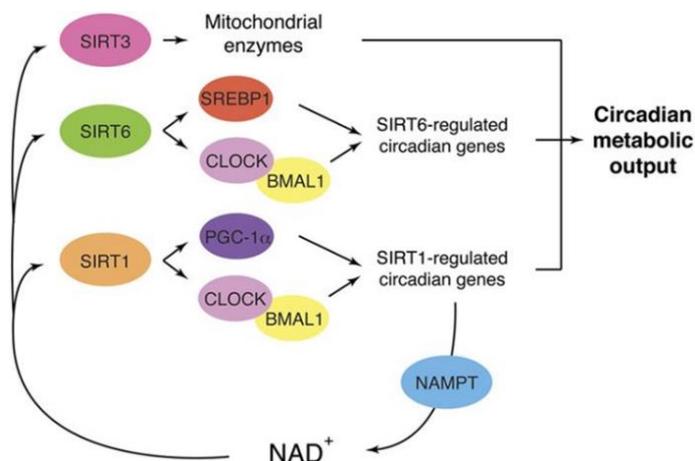


Figura 6. Regulación circadiana del metabolismo de NAD<sup>+</sup> por sirtuinas y NAMPT (30).

SIRT6, está vinculada al envejecimiento mediante la regulación de la estabilidad de los telómeros y la inflamación. La desacetilación de la histona H3K9 parece ser la modificación que conecta la actividad SIRT6 con estas vías de envejecimiento. SIRT 3 es la principal proteína desacetilasa mitocondrial: aumenta la actividad de las enzimas mitocondriales clave involucradas en la protección contra el estrés oxidativo y envías metabólicas intermedias (32). Las sirtuinas tienen un papel de mejora de la salud general. Muchas investigaciones usando una mutación de ganancia de la función sirtuina, han demostrado que estas enzimas promueven la longevidad en levaduras, gusanos, moscas y ratones, y pueden paliar muchas enfermedades asociadas al envejecimiento en modelos murinos, como diabetes tipo 2, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades proinflamatorias (20). Al aumentar la sensibilidad a la insulina hepática, la tolerancia a la glucosa hepática y la respiración mitocondrial, producen una mayor eficiencia metabólica general, un incremento en la esperanza de vida, y un envejecimiento saludable (2, 29).

SIRT6, está vinculada al envejecimiento mediante la regulación de la estabilidad de los telómeros y la inflamación. La desacetilación de la histona H3K9 parece ser la modificación que conecta la actividad SIRT6 con estas vías de envejecimiento. SIRT 3 es la principal proteína desacetilasa mitocondrial: aumenta la actividad de las enzimas mitocondriales clave involucradas en la protección contra el estrés oxidativo y envías metabólicas intermedias (32). Las sirtuinas tienen un papel de mejora de la salud general. Muchas investigaciones usando una mutación de ganancia de la función sirtuina, han demostrado que estas enzimas promueven la longevidad en levaduras, gusanos, moscas y ratones, y pueden paliar muchas enfermedades asociadas al envejecimiento en modelos murinos, como diabetes tipo 2, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades proinflamatorias (20). Al aumentar la sensibilidad a la insulina hepática, la tolerancia a la glucosa hepática y la respiración mitocondrial, producen una mayor eficiencia metabólica general, un incremento en la esperanza de vida, y un envejecimiento saludable (2, 29).

### Relación entre las enzimas de consumo de NAD<sup>+</sup>

Estas enzimas no actúan de forma independiente unas de otras, sino que hay conexiones entre sus procesos celulares, tanto de forma sinérgica como antagónica. Todas estas enzimas usan NAD<sup>+</sup> por lo que una variación en sus niveles afecta a todas ellas. La hiperactividad de una de las enzimas puede limitar las actividades de las otras y, por el contrario, la inhibición de una puede aumentar el NAD<sup>+</sup> total para las otras (11). Si hay un gran daño en el ADN y PARP se sobreactiva para repararlo, NAD<sup>+</sup> sería usado en exceso y provocaría un descenso del NAD<sup>+</sup> disponible, lo que dificulta su uso por las sirtuinas, disminuyendo sus funciones (15). Por otra parte, PARP1 mantiene controlado DBC1, que es un conocido inhibidor de SIRT1. Si NAD<sup>+</sup> disminuye, el control de PARP1 sobre DBC1 se reduce, y las funciones de SIRT quedan inhibidas (15). SIRT1 también inhibe PARP1 a través de la desacetilación y a nivel transcripcional (32). Los cambios en CD38 también afectan a las demás enzimas que degradan NAD<sup>+</sup>, al ser la principal NADasa en tejido (11).

### **5.3. DISFUNCIÓN EN EL METABOLISMO DEL NAD<sup>+</sup>**

#### **Disminución de NAD<sup>+</sup>**

Las concentraciones celulares de NAD<sup>+</sup> cambian bajo diversas condiciones y fluctúan de manera circadiana. Aumentan en respuesta a cargas de energía bajas, como el ayuno, la privación de hidratos de carbono, la restricción calórica y el ejercicio, y disminuyen con dietas elevadas en grasas, en alteraciones metabólicas, y en el envejecimiento y la senescencia. El hecho de que las concentraciones de NAD<sup>+</sup> aumenten en condiciones que aumentan la vida útil o la salud y disminuyen en condiciones que disminuyen la vida útil o la salud, respalda que la disfunción del metabolismo de NAD<sup>+</sup> se relaciona con un estado metabólico no saludable, no óptimo, o deteriorado (32).

En un estudio se analizaron muestras de sangre humanas para comprobar la variación de los metabolitos con la edad. Se observó que los metabolitos que decrecen de forma significativa en los ancianos incluyen antioxidantes, compuestos involucrados con el ejercicio físico, como compuestos que apoyan el refuerzo y el mantenimiento muscular, y metabolitos redox, incluyendo NAD<sup>+</sup>. Tomando los datos de este estudio se dedujo que los compuestos de mantenimiento celular disminuyen con la edad (33).

En 2019, se llevó un estudio en el que se cuantificaron los cambios en los niveles de NAD<sup>+</sup> en muestras de plasma recolectadas de sujetos humanos sanos en un amplio rango de edad (20–87 años). Los datos mostraron una abrupta disminución en los niveles plasmáticos de NAD<sup>+</sup> con la edad. Los sujetos de edad avanzada (60-87 años) tenían niveles significativamente más bajos en comparación con los de mediana edad (40-60 años), y estos a su vez son más bajos que los de los más jóvenes (20-40 años). Se ha demostrado que una proporción baja de NAD<sup>+</sup>/NADH está asociada con el envejecimiento muscular y una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. Estos datos sugieren que las alteraciones relacionadas con la edad están asociadas con alteraciones en el metabolismo de NAD<sup>+</sup> (27).

En otro estudio, se analizaron los cambios en los niveles de NAD<sup>+</sup> en diferentes tejidos metabólicos, para dos variables, envejecimiento y obesidad. En hígado humano se observó la disminución de estos niveles en individuos de 60 o más años con respecto a individuos de 45 o menos. En ratones se encontraron disminuciones en animales de 24 meses frente a 3-6 meses de edad, tanto en hígado, como en músculo esquelético y tejido adiposo. Estas disminuciones también se encontraron en humanos y animales obesos, frente a los no obesos, sin la variable edad (34).

La disminución constante de NAD<sup>+</sup> ocurre como parte del proceso de envejecimiento, la disfunción metabólica y las enfermedades relacionadas con la edad en muchas especies, desde la levadura hasta los humanos (3, 13, 15, 19, 35). Se ha observado que, en ratones, varios tejidos y órganos muestran disminuciones en los niveles de NAD<sup>+</sup> con la edad, causando disfunciones metabólicas, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, inflamación crónica y cáncer (31). La simultaneidad de la disminución de la biosíntesis de NAD<sup>+</sup> y el aumento del su consumo, agrava su agotamiento. Cuál contribuye más a su disminución depende de la especie, los tejidos y los tipos de células (19).

#### **El envejecimiento y NAD<sup>+</sup>**

El envejecimiento implica multitud de cambios morfológicos y fisiológicos en todos los tejidos, y su estudio esclarece las diferencias fisiopatológicas entre los ancianos y el resto de la población adulta (36). Sabiendo que el NAD<sup>+</sup> disminuye de forma constante en el envejecimiento, hay una necesidad de comprender cuáles son las consecuencias de esta disminución en la disfunción celular durante el envejecimiento (37).

Actualmente se conoce que las enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$  llevan a cabo la señalización de las vías implicadas en las principales causas de enfermedad y discapacidad durante el envejecimiento. Muchas de las fisiopatologías asociadas a la edad por la disminución de  $\text{NAD}^+$ , están mediados principalmente por la afectación que tiene esta disminución en los niveles de sirtuinas (19), especialmente SIRT1, SIRT3 y SIRT6 (37), y en menor medida por las PARP y CD38. La interrupción de las funciones de estas enzimas afecta a la susceptibilidad de los órganos al deterioro y genera problemas como

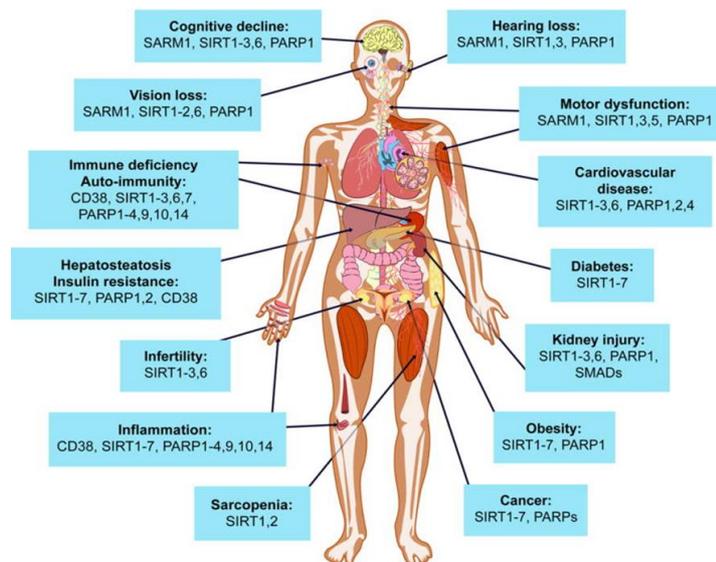


Figura 7. Consecuencias de la disminución de  $\text{NAD}^+$  (13)

(37) (Figura 7 (13)) : pérdida auditiva; problemas oculares como degeneración de la retina asociada a la edad, inducida por luz o retinopatía diabética, puesto que se ha descubierto la importancia de SIRT3 y SIRT5 en la supervivencia de los fotorreceptores retinianos (19) ; declive cognitivo y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, enfermedad en la que se ha encontrado un patrón claro de descenso de actividad SIRT1 (19); depresión, relacionada tanto con SIRT1 como con SIRT2 (19); disfunción muscular y pérdida de la capacidad de movilidad; lesión renal; descontrol de la respuesta inflamatoria e inmune generando problemas articulares como la artritis y otros problemas autoinmunitarios (13); enfermedad cardiovascular y arterosclerosis por desregulación de los lípidos en sangre, ya que la disminución de SIRT1 evoca lipólisis en tejido adiposo; varios tipos de cáncer directamente relacionado con las PARP por su influencia en el mantenimiento del material genético y la desregulación de los factores de transcripción; alteraciones metabólicas por disfunción mitocondrial, la consecuencia inmediata de la inhibición de las sirtuinas, que incluye entre otros problemas, diabetes tipo dos, por pérdida de la homeostasis de la glucosa y desensibilización a la insulina, obesidad, involucrada con la inflamación crónica, y enfermedad del hígado graso no alcohólico, ya que se ha observado que estos enfermos, tienen un descenso en SIRT1, 3, 5 y 6 (13, 19).

Por otro lado, las señas de identidad asociadas al envejecimiento también pueden estar reguladas por el metabolismo del  $\text{NAD}^+$ . Un estudio recoge las evidencias que se conocen hasta ahora sobre la relación entre ambos (11, 38):

- Inestabilidad genómica: la acumulación de daño en el ADN puede contribuir al envejecimiento, posiblemente debido a reparación deteriorada del ADN. En este punto PARP puede jugar un papel clave (11, 38).
- Desgaste de telómeros: no hay estudios disponible de la relación con  $\text{NAD}^+$  (11, 38)
- Alteraciones epigenéticas: tanto SIRT como PARP tienen acciones epigenéticas (32, 38).
- Agotamiento de células madre: varios estudios indican que la restauración de los niveles de  $\text{NAD}^+$  previno la senescencia de células madre en ratones (11, 38).
- Pérdida de proteostasis: con la edad se pierde en mantenimiento de la estabilidad para mantener un correcto plegamiento en las proteínas. El aumento de  $\text{NAD}^+$ , activó la respuesta de la proteína desplegada, activó FOXO1 y se transcribieron factores para las defensas antioxidantes en levaduras, gusanos y ratones, prolongando la vida útil y la salud (11, 38).

- **Disfunción mitocondrial:** La abundancia y la calidad mitocondrial son fundamentales para la salud, y la disfunción mitocondrial es un sello distintivo del envejecimiento, detectado en un amplio espectro de enfermedades asociadas a la edad. A través de las sirtuinas,  $NAD^+$  previene la disfunción mitocondrial, mejora la biogénesis y promueve la mitofagia. (11, 38, 39).
- **Sensibilidad a la detección de nutrientes desregulada:** las sirtuinas detectan el crecimiento de las concentraciones de  $NAD^+$  en situaciones de ayuno o deficiencia en nutrientes. En los ancianos, los ínfimos niveles del dinucleótido provocan que los efectos beneficiosos en la salud por restricción de calorías desaparezcan, por inhibición de SIRT1 y SIRT3 (11, 38).
- **Senescencia celular:** las células senescentes se manifiestan en los tejidos con el paso de los años. En estos tejidos envejecidos, se ha demostrado una reducción en la cantidad de  $NAD^+$ , lo que ha mostrado una relación entre el metabolismo deficiente de  $NAD^+$  y la senescencia (11, 27, 33, 38).
- **Autofagia comprometida:** Es una marca clara de envejecimiento. La inducción de autofagia puede retrasar el deterioro en la vejez y la progresión de enfermedades relacionadas con la edad. El aumento de  $NAD^+$ , mejoró la autofagia en el epitelio pigmentario de la retina.  $NAD^+$  indujo la autofagia en células senescentes (11, 38).
- **Comunicación celular alterada:** en el envejecimiento se produce inflamación crónica que afecta a la comunicación celular (38). SIRT1, media los cambios en la expresión de genes inflamatorios relacionados con la edad. Por otra parte, el aumento de actividad SIRT1, retrasa la degeneración del axón, y mejora la comunicación neuronal (40). En referencia a la comunicación intracelular, varios estudios demostraron que una disminución en  $NAD^+$  con la edad interrumpió la comunicación mitocondria-núcleo por inactivación de SIRT1, precipitando las primeras etapas de la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento en el músculo esquelético (21, 30) (Figura 8-a (30)).

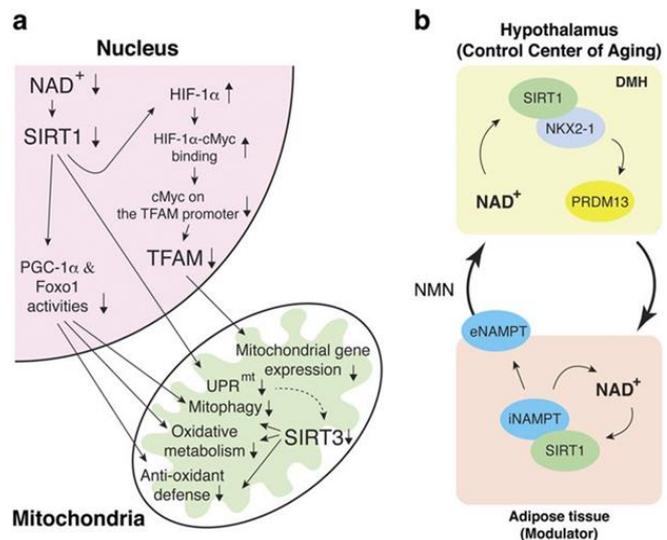


Figura 8. a. comunicación núcleo-mitocondria alterada. b. comunicación hipotálamo-tejido adiposo alterada (30).

Además se produce una comunicación alterada entre tejidos. La desconexión de la comunicación entre tejidos, como el hipotálamo y el tejido adiposo, esta mediada por las isoformas de NAMPT,  $NAD^+$  y SIRT1 (30)(Figura 8-b (30)).

### Posibles mecanismos de la disminución de $NAD^+$

La acumulación crónica de daños a lo largo de la vida representa el fenotipo principal asociado al deterioro fisiológico (41). En particular, el estrés oxidativo (42), la inflamación crónica, los radicales libres de oxígeno, y la desregulación del ritmo circadiano, pueden jugar un papel clave en la disfunción mitocondrial y la alteración de la biogénesis, que se cree que son los principales problemas originados por la disminución de  $NAD^+$  (37, 43, 44). Por lo tanto, esta reducción en los niveles de  $NAD^+$  tiene un papel crucial en el desarrollo de la disfunción metabólica y las fisiopatologías asociadas a la edad (19, 37).

Asimismo, la disminución de  $\text{NAD}^+$  y la pérdida de la función SIRT1 con el envejecimiento, da como resultado el defecto en la ritmicidad circadiana normal, lo que se ha asociado a una variedad de problemas metabólicos y vejez prematura (3, 20). Esto hace pensar en la existencia de un bucle que se retroalimenta, pues los procesos que se proponen como causantes del envejecimiento, como el estrés oxidativo, el daño al ADN, el deterioro de la ritmicidad circadiana, la senescencia y la inflamación crónica, conducen a la disminución de  $\text{NAD}^+$ , y esto a su vez genera la disfunción metabólica que interviene en el envejecimiento y que empeora los procesos que causaron la reducción de  $\text{NAD}^+$  (37) (Figura 9).

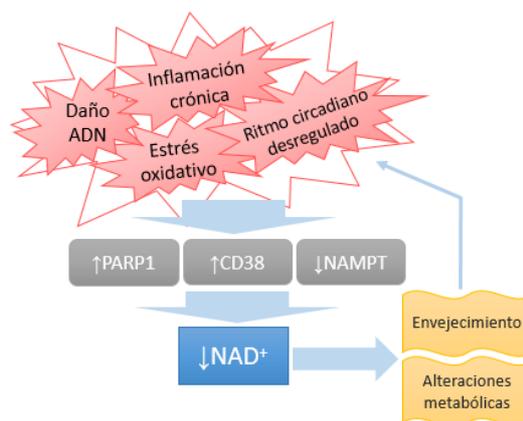


Figura 9. Posibles mecanismos de disminución de  $\text{NAD}^+$

Para explicar la depleción de  $\text{NAD}^+$ , se proponen algunos mecanismos:

#### A. Deterioro de la biosíntesis de $\text{NAD}^+$ . Vía de rescate deficiente.

Se ha comprobado que la expresión de NAMPT se reduce con la edad y en las alteraciones metabólicas tanto en los niveles de ARN mensajero como de proteína, en una variedad de tejidos, como páncreas, tejido adiposo blanco y músculo esquelético (40, 45, 46). Esto puede deberse a la regulación defectuosa del ritmo circadiano (20, 30, 32), ya que la transcripción del gen NAMPT está mediada por los factores clave de la transcripción circadiana CLOCK/BMAL (30), o por el estrés oxidativo y la inflamación crónica asociada al envejecimiento (20, 32, 45), ya que se ha sugerido que las citocinas inflamatorias disminuyen la expresión de NAMPT (30). En un estudio se ha observado que ratones jóvenes con depleción inducida de NAMPT en músculo, mostraron degeneración en la fibra muscular y pérdida de masa, fuerza y resistencia, mientras que la sobreexpresión de NAMPT aumentó los niveles de  $\text{NAD}^+$  y mejoró la función física de ratones envejecidos (11, 21). Por otra parte, se ha descubierto que las células beta pancreáticas, expresan bajos niveles de proteína NAMPT en comparación con otras células y son particularmente vulnerable a la inhibición de NAMPT(11).

#### B. Aumento de la degradación

Otra causa de la disminución de  $\text{NAD}^+$  con la edad es el aumento de su consumo, de tal forma que la síntesis queda superada por la alta demanda en la degradación. En este posible mecanismo quedan implicadas las enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$ , PARP y CD38 (27). Una hiperestimulación de estas enzimas sería suficiente para disminuir el  $\text{NAD}^+$  (32). Las sirtuinas parecen tener un papel menor en la degradación de  $\text{NAD}^+$ , por lo que no se barajan como un posible mecanismo (37).

##### B.1. Aumento del consumo por PARP

El daño excesivo en el ADN, lleva a la hiperactivación de PARP. Esto conduce a un elevado gasto y posterior agotamiento de  $\text{NAD}^+$ . La crisis energética resultante y la producción reducida de ATP pueden conducir a la muerte celular (42). Tras su medición, la actividad de PARP fue mayor en varios tejidos en ratas viejas en comparación con animales jóvenes. Y se ha demostrado que esta actividad también aumenta con la edad en piel humana (27, 47). El daño al ADN que se acumula con la edad puede ser el responsable de la hiperactivación de PARP, y por tanto la disminución de  $\text{NAD}^+$  que se da en el envejecimiento (19, 32, 47). La activación continua de PARP, al reducir el conjunto  $\text{NAD}^+$  provoca la disminución de la actividad de SIRT1, lo que dificulta sus funciones y empeora el envejecimiento y la longevidad. Cuando

PARP1 es eliminado, los niveles de  $\text{NAD}^+$  y la actividad SIRT1 aumentan significativamente (19). Se ha relacionado la hiperactividad de PARP1 con enfermedades degenerativas (47).

### B.2. Aumento del consumo por CD38

CD38 se encarga de la mayor parte de la degradación de  $\text{NAD}^+$ . Esta NADasa, además, puede degradar los precursores NMN y NR (11, 19, 27). La expresión de CD38 y su actividad, aumentan en múltiples tejidos y órganos a lo largo de la edad, lo que contribuye a la disminución de  $\text{NAD}^+$  (19). Varios estudios sobre CD38 en los tejidos murinos señalaron el aumento de  $\text{NAD}^+$  dependiente de la edad, y documentaron, usando ratones con deficiencia inducida de CD38, que esta enzima es imprescindible para la depleción de  $\text{NAD}^+$  (11). Los ratones que carecen de CD38 mostraron mayores concentraciones de  $\text{NAD}^+$  en el cerebro, el hígado y los músculos (32). En estos ratones, a los 36 meses, se mantuvieron estables los niveles de  $\text{NAD}^+$ , la respiración mitocondrial y las funciones metabólicas (19). Estuvieron protegidos contra la obesidad y el síndrome metabólico (25). Esto indica que el mantenimiento de los niveles del dinucleótido por deficiencia de CD38 también presenta beneficios en las alteraciones metabólicas. Es importante señalar, que además mostraron una neuroprotección significativa en el cerebro a pesar de los altos niveles de poli-ADP-ribosilación (PARP), lo que revela que el  $\text{NAD}^+$  disponible sin CD38, parece ser suficiente para permitir la actividad de Parp1, Sirt1 y otras enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$  (11). En un estudio que analizó los niveles de expresión de las enzimas que consumen  $\text{NAD}^+$ , se observó que CD38 parece más implicado en la degradación de  $\text{NAD}^+$  que PARP1. Los niveles de la NADasa aumentaron al menos 2-3 veces durante el envejecimiento en todos los tejidos analizados (25) (Figura 10 (25)).

Con respecto a por qué CD38 aumenta, se piensa que la acumulación continuada de estrés oxidativo e inflamación durante la edad avanzada, provoca un aumento crónico en la activación inmune y en la producción de citoquinas. Al ser CD38 un receptor de células inmunes, esto impulsa de alguna forma no conocida su actividad y contribuye a la disminución de  $\text{NAD}^+$  (42).

### Relación con las alteraciones metabólicas

Una disfunción metabólica implica la alteración de una o más vías bioquímicas que forman parte de algún proceso fisiológico normal del organismo, y conduce a acumulación de los sustratos iniciales, deficiencia de los productos finales o desarrollo de rutas metabólicas alternativas. Las alteraciones metabólicas en las que  $\text{NAD}^+$  toma importancia no son las de origen genético, sino las adquiridas. Aquellas en las que el estilo de vida afecta a los patrones epigenéticos de los genes implicados, y se modifican con el paso del tiempo (5).

La manipulación genética de la síntesis de  $\text{NAD}^+$  o las enzimas que lo degradan, ha establecido que la reducción en los niveles de  $\text{NAD}^+$  causa trastornos metabólicos en ratones. Además, la creciente evidencia ha demostrado que complementar con precursores de  $\text{NAD}^+$  mejora varias enfermedades metabólicas. El metabolismo  $\text{NAD}^+$  se destaca como un objetivo terapéutico para los trastornos metabólicos, como la obesidad, la diabetes tipo dos, la dislipidemia y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (34, 45).

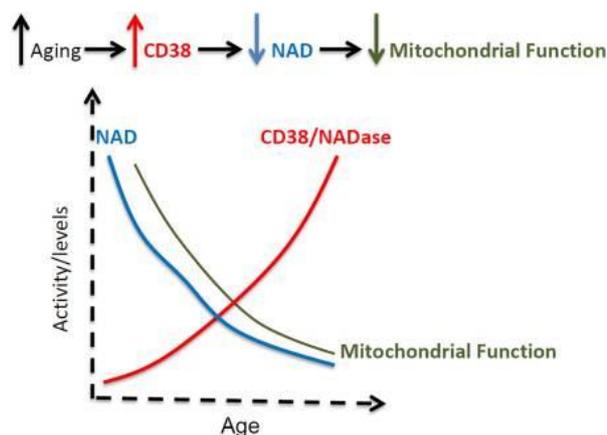


Figura 10. La NADasa CD38 aumenta durante el envejecimiento, y causa la disminución de  $\text{NAD}$  y la disfunción mitocondrial posterior (25).

El metabolismo de  $\text{NAD}^+$  tiene un efecto protector contra diversas enfermedades metabólicas a través de reacciones redox, sirtuinas y PARP.  $\text{NAD}^+$  media varias reacciones del metabolismo redox: la glucólisis, el ciclo TCA, la oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa. También al ser sustrato para PARP y sirtuinas, regula varias vías biológicas involucradas en metabolismo energético como es la expresión génica asociada y la respuesta celular al estrés (34). La activación de SIRT1 pone en marcha a PGC-1 $\alpha$  y FOXO1, por lo que juega un papel clave en la función mitocondrial y sensibilidad a insulina (29) (Figura 11 (34)). Varios estudios han demostrado que los niveles de  $\text{NAD}^+$  disminuyen un estado nutricional aberrante, como la obesidad. La disminución de los niveles de  $\text{NAD}^+$  suprime las actividades de las enzimas del metabolismo redox, lo que resulta en una menor producción de ATP y las actividades de las PARP y las sirtuinas conduciendo a la desregulación del metabolismo energético. Por lo tanto, se sugiere prevenir la disminución de  $\text{NAD}^+$  como una estrategia prometedora para combatir los trastornos metabólicos (34, 48)

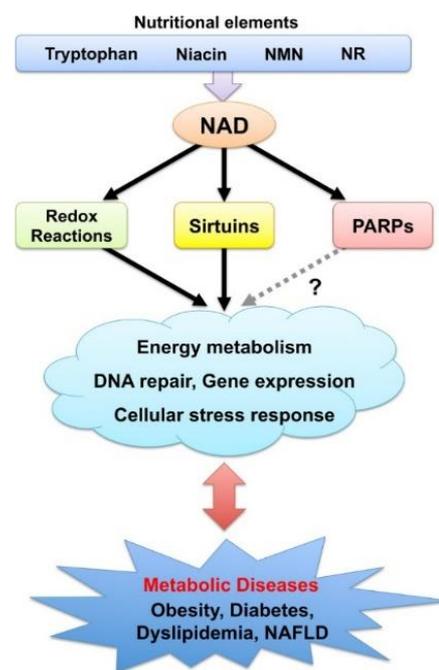


Figura 11.  $\text{NAD}^+$  y alteraciones metabólicas (34).

#### 5.4. INTERVENCIONES PARA RESTAURAR LOS NIVELES DE $\text{NAD}^+$

Como es lógico, si la disminución de  $\text{NAD}^+$  origina procesos degenerativos y alteraciones metabólicas, el objetivo terapéutico para contrarrestar estos efectos, es la búsqueda de terapias que aumenten de los niveles de  $\text{NAD}^+$  o prevengan su bajada (3).

Han surgido dos estrategias principales: la inhibición de las enzimas consumidoras de  $\text{NAD}^+$  (PARP1 y CD38) que se han sobreexpresado, y la suplementación con precursores biosintéticos. Estas dos estrategias conducen a una mayor disponibilidad de  $\text{NAD}^+$ , lo que permitiría su uso por las SIRT y las demás enzimas para los procesos fisiológicos, y con ello obtener los efectos beneficiosos sobre enfermedades asociadas a la edad (3).

La reducción de  $\text{NAD}^+$  como el mecanismo central que puede conectar el envejecimiento con sus patologías relacionadas, hace pensar en una forma de restaurar estos niveles para solucionar el problema. El aumento en los niveles de  $\text{NAD}^+$  garantizaría y mejoraría la calidad de la salud durante el envejecimiento, al prevenir enfermedades relacionadas con la edad (4).

##### Inhibición de PARP:

La terapia con inhibidores de PARP, sería útil en aquellas situaciones en las que PARP aparece sobreexpresado y esto provoca bajos niveles de  $\text{NAD}^+$ , como en los procesos neurodegenerativos. En estos, las células están expuestas a un mayor estrés oxidativo, y los PARP juegan un papel central en la reparación del daño del ADN. Se han realizado diferentes estudios en modelos animales, sobre todo con ratones modificados para la Enfermedad de Alzheimer y Parkinson, e inhibición de PARP1, y se han encontrado beneficios de la inhibición en estas enfermedades, ya que se genera cierta neuroprotección. Los inhibidores de PARP previenen la despolarización de la membrana mitocondrial y la muerte neuronal en los cocultivos de astrocitos y neuronas expuestas al  $\beta$ -amiloide. La regeneración axonal mejora en neuronas de *Caenorhabditis elegans* y cultivos neuronales de ganglios de la raíz dorsal de humanos (3). La inhibición de PARP1 también puede ser un objetivo terapéutico en alteraciones metabólicas, ya que se ha comprobado que mejora estos trastornos a través de la activación de SIRT1 (19).

### Inhibición de CD38:

Al ser CD38 la mayor implicada en la degradación de NAD<sup>+</sup> con la edad, la búsqueda de inhibidores sería de gran interés terapéutico. El inconveniente, es que dado que CD38 se encuentra muy distribuida en diferentes tipos celulares, entre ellos sistema inmune y nervioso, y desempeña un papel en muchos procesos biológicos complejos su inhibición puede afectar a los procesos fisiológicos normales y en especial a los neurodegenerativos, en formas difíciles de predecir.

Se ha observado, que in vitro, CD38 es inhibida a bajas concentraciones por flavonoides, incluyendo luteolinidina, apigenina, kuromanina, luteolina y quercetina (13). En un estudio in vivo, la inhibición de CD38 usando apigenina, aumentó los niveles de NAD<sup>+</sup> en múltiples tejidos y se generó protección contra la degeneración en ratones obesos por una dieta elevada en grasas, al mejorar la homeostasis de la glucosa y los lípidos (25, 27). Del mismo modo, la luteolinidina evita la depleción del dinucleótido y preserva la función miocárdica y endotelial en el corazón post-isquémico (13). CD38 regula la migración de macrófagos y microglía a mediadores inflamatorios como el  $\beta$ -amiloide. En un modelo de ratón con Alzheimer, inhibir el CD38 reduce notablemente la carga del  $\beta$ -amiloide y mejora el aprendizaje (3).

### Uso de precursores biosintéticos de NAD<sup>+</sup>

La intervención dietética es una forma ideal de aumentar los niveles de NAD<sup>+</sup> en células y tejidos. Como es lógico, los estudios sobre esta terapia comenzaron con la suplementación oral con NAD<sup>+</sup>/NADH, sin embargo, no se consiguió una elevación significativa en los niveles plasmáticos o tisulares, debido a que es impermeable a la membrana plasmática, y aún no se ha identificado un transportador intestinal para él en mamíferos; por lo que la administración de la molécula NAD<sup>+</sup> o NADH, conduce a una pobre biodisponibilidad (3, 17, 34). Un estudio que realizó una infusión intravenosa de NAD<sup>+</sup> durante 6 horas, ha sido el único medio para aumentar los niveles sistémicos de NAD<sup>+</sup>, con la molécula NAD<sup>+</sup>, y supuso buenos resultados en cuanto a seguridad general y tolerabilidad (17, 49). Para solventar la baja biodisponibilidad oral de NAD y evitar el uso de la infusión intravenosa, se han estudiado los precursores, que pueden absorberse vía oral y restaurar la disponibilidad del dinucleótido al incorporarse a las vías biosintéticas. Los precursores de NAD, como el ácido nicotínico (NA), la nicotinamida (NAM), el mononucleótido de nicotinamida (NMN) y el ribósido de nicotinamida (NR), y el recientemente descubierto NAR, se utilizan para aumentar los niveles de NAD en roedores y humanos. En particular, NMN y NR, son los que mejores resultados están dando (3, 17, 34). La mejora de salud general, el aumento de la vida útil, la mejora en los trastornos metabólicos, la reducción de la atrofia muscular o la neuroprotección, son algunos de los beneficios de la suplementación con precursores, que han impulsado el interés sobre esta terapia (3).

El **ácido nicotínico (NA)**, se prescribe clínicamente para el tratamiento de la hiperlipidemia (50). Hace poco que se le ha atribuido su efecto clínico al aumento de NAD<sup>+</sup>. Sin embargo, la terapia de NA provoca enrojecimiento de la piel, lo que ha limitado sus usos clínicos (13, 17). La **nicotinamida (NAM)**, es una molécula no cargada, que difunde a través de las membranas rápidamente (13). Su uso clínico es para el tratamiento de la pelagra y la hiperlipidemia (50). Se genera como producto en las reacciones de degradación de NAD<sup>+</sup>. Las SIRT son especialmente sensibles a NAM, ya que un acumulo de esta las inhibe (17). Esto sumado a que su acumulación parece relacionarse con el acortamiento de la vida útil (37), ha hecho que su uso como precursor haya pasado a un segundo plano.

El **ribósido de nicotinamida (NR)** y el **mononucleótido de nicotinamida (NMN)**, son moléculas solubles y biodisponibles por vía oral, lo que las convierte en las moléculas perfectas para experimentos con animales y ensayos clínicos en humanos (3, 13), y son los dos precursores que mejor han aumentado los niveles de NAD<sup>+</sup> en diferentes tejidos en muchos casos con efectos beneficiosos o terapéuticos (51), posiblemente debido a una mayor absorción

(13). NR puede introducirse en la célula, donde se fosforila por las NRK para producir NMN (3), por lo que ambos se unen a la biosíntesis en el mismo punto en la vía de rescate. En estudios a medio-largo plazo, se ha demostrado que aumentan de forma segura sin efectos nocivos los niveles de  $\text{NAD}^+$  en ratones y humanos (3, 52). Con respecto a los beneficios observados al administrar NR y NMN en animales, hay una larga lista prácticamente para cada sistema del organismo: mejora de la función muscular (35), cardíaca, renal y neuronal, prevención de hepatotoxicidad y mejora de la regeneración del hígado (53), efectos antiinflamatorios, beneficios en enfermedades autoinmunes, neuroprotección, beneficios en enfermedades neurodegenerativas (3, 13, 54). Con respecto a las alteraciones metabólicas, ratones tratados con estos precursores, corrigieron sus disfunciones metabólicas (35) y presentaron mejor sensibilidad a la insulina, mayor tolerancia a la glucosa y mejores perfiles de lípidos (13, 34, 55). De especial interés resulta como el impulso de  $\text{NAD}^+$  a través de NR y NMN puede aumentar la longevidad y prevenir enfermedades relacionadas con la edad en modelos animales (4, 56). En ratones viejos, se mitigó el deterioro fisiológico asociado a la edad (3). Con NR, se extendió su vida útil en casi un 5%, mejoró la función mitocondrial y se conservó la función de las células madre (57). Además, con respecto a problemas asociados a la edad, se mejoró la visión, se aumentó la densidad del hueso, se revertió la disfunción vascular y disminuyó el estrés oxidativo (58, 59).

En humanos los estudios muestran esta terapia como una estrategia prometedora para combatir tanto los trastornos metabólicos, como el envejecimiento y sus enfermedades asociadas. Hoy en día, hay multitud de ensayos clínicos registrados, en curso o recientemente completados para demostrar sus beneficios en la salud.

#### Otros enfoques terapéuticos

La estimulación de la biosíntesis con activadores de NAMPT, sería una estrategia prometedora, aunque actualmente solo se ha hallado P7C3 y no con muy buenos resultados (13).

Otro enfoque podría ser la enzima NNMT responsable de la excreción de NAM metilada, con gasto del cofactor SAM. Se ha observado una relación entre la sobreexpresión de NNMT y diversas enfermedades humanas (60). Por otro lado, tanto la acumulación de su sustrato, NAM, como el gasto de SAM, se han relacionado con el envejecimiento. Por lo NNMT, debe ser un blanco de estudio en investigaciones futuras (37).

### **5.5. LIMITACIONES**

La principal limitación es lo poco que se conoce aún de muchas vías implicadas en el metabolismo del  $\text{NAD}^+$ , el envejecimiento y las alteraciones metabólicas. Para establecer todas las relaciones entre estos aspectos serían necesarios muchos más estudios y el avance de las técnicas científicas, ya que hasta ahora no se han podido esclarecer todas las dudas que surgen con respecto a estos procesos, y dejan cuestiones aún sin resolver como es el mecanismo del envejecimiento. Hace falta más investigación para conocer mejor la interacción y la distribución, extracelular, celular y subcelular, entre las vías que regulan la homeostasis del  $\text{NAD}^+$ . También, más información sobre dónde encajan en estas vías los precursores y otros metabolitos relacionados. Asimismo, aunque muchos estudios han relacionado que los efectos fisiológicos beneficiosos del aumento de  $\text{NAD}^+$  son mayoritariamente dependientes de la activación de sirtuinas, queda por esclarecer los mecanismos de otros de los efectos beneficiosos que produce y que no se deben a la activación de estas. Por otro lado, multitud de estos estudios están realizados en modelos murinos, pero la traducción a modelos humanos, aunque por ahora con muy buenos resultados, es aún escasa. La seguridad de los compuestos impulsores de  $\text{NAD}^+$ , tanto precursores como inhibidores de las enzimas que lo degradan, en humanos aún requieren una evaluación exhaustiva. En definitiva, aunque se ha

observado el potencial de las terapias NAD<sup>+</sup> para tratar patologías relacionadas con la edad, faltan puntos por esclarecer, que seguramente puedan resolverse y tengan gran impacto en un futuro gracias a la investigación (21).

## 6. CONCLUSIONES

NAD<sup>+</sup> está involucrado en tantos procesos celulares que el estudio de sus funciones debe esclarecerse con mayor exactitud. Presenta un metabolismo muy complejo al incluir varias vías biosintéticas y diferentes modos de degradación. Los niveles de NAD<sup>+</sup> exponen el estado metabólico celular. La disfunción del metabolismo de NAD<sup>+</sup> en los seres vivos está relacionada con un estado metabólico deteriorado. La bajada de NAD<sup>+</sup> conduce principalmente a inhibición de la actividad sirtuina, lo que se traduce en la aparición de disfunción mitocondrial y supone la manifestación de fisiopatologías. Entender cómo se produce la disminución de estos niveles en las alteraciones metabólicas y el envejecimiento resultará clave para encontrar una terapia que ayude a restaurar dichos niveles ya sea con activadores de la síntesis, inhibidores de la degradación por parte de PARP y CD38, o con precursores como NMN y NR. Hoy en día, encontramos limitaciones en estos tratamientos para el ser humano por la falta de estudios finalizados, pero la investigación futura permitirá esclarecer todos los detalles tanto de cómo el metabolismo de NAD<sup>+</sup> regula las alteraciones metabólicas y el envejecimiento, como de las terapias para tratarlos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Silverthorn DU, Johnson BR, Ober WC, Ober CE, Impaglizzo A, Silverthorn AC. Fisiología humana: un enfoque integrado. Ciudad de México: Médica Panamericana; 2019. Available from: <https://www.medicapanamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9786078546237>.
2. Genaro Gabriel Ortiz EDÁ-M, Irma E. Velázquez-Brizuela, Fermín P. Pacheco-Moisés, Luis J. Flores-Alvarado, Erandis D. Torres-Sánchez, Fernando Cortés-Enríquez, Erika D. González-Renovato, Irma G. Ortiz-Velázquez. Envejecimiento y metabolismo: cambios y regulación. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2012;62.
3. Mariana Pehar BAH, Kelby M. Killoy, and Marcelo R. Vargas. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolism and Neurodegeneration. Antioxidants & Redox Signaling. 2018;28(18):1652-68.
4. Garrido A, Djouder N. NAD<sup>+</sup> Deficits in Age-Related Diseases and Cancer. Trends in Cancer. 2017;3(8):593-610.
5. MJ. RA. Medicamentos biológicos destinados al tratamiento de enfermedades endocrinas y metabólicas. 2019.
6. Oyarzún Mejía AdP. Rol de Nad<sup>+</sup> en el metabolismo y la respuesta adaptativa del cardiomiocito. 2014.
7. Martínez. JISGJMC. Coenzima. Web 2015 [Available from: <http://bioquimica-405-coenzima.blogspot.com/2015/>].
8. Martínez Montes F, Pardo Vázquez JP, Riveros Rosas Hc. Bioquímica de Laguna y Piña (8a. ed.). Ciudad de México: Editorial El Manual Moderno; 2018. Available from: <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=5635070>.
9. Pérez G. Coenzimas NAD<sup>+</sup> y NADH [Available from: [https://www.coenzima.com/coenzimas\\_nad\\_y\\_nadh](https://www.coenzima.com/coenzimas_nad_y_nadh)].
10. Feduchi Canosa E. Bioquímica / Conceptos esenciales: Editorial Médica Panamericana.; 2015. Available from: <http://www.medicapanamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9788498358742>  
<http://www.medicapanamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9788498354843>.

11. Fang EF, Lautrup S, Hou Y, Demarest TG, Croteau DL, Mattson MP, et al. NAD<sup>+</sup> in aging: molecular mechanisms and translational implications. *Trends in molecular medicine*. 2017;23(10):899-916.
12. Kim J, Lee SH, Tieves F, Paul CE, Hollmann F, Park CB. Nicotinamide adenine dinucleotide as a photocatalyst. *Science advances*. 2019;5(7):eaax0501.
13. Rajman L, Chwalek K, Sinclair DA. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab*. 2018;27(3):529-47.
14. Voet D. *Fundamentos de Bioquímica / La vida a nivel molecular: Editorial Médica Panamericana.*; 2016. Available from: <http://www.medicapanamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9786079356972>.
15. Takihara Y, Sudo D, Arakawa J, Takahashi M, Sato A, Tanuma S-i, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) and cell aging. *New Research on Cell Aging and Death* Hauppauge, NY: Nova Science Publishers. 2018:131-58.
16. Dvorkin MA, Cardinali DP. *Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica: Ed. Médica Panamericana;* 2011.
17. Braidy N, Berg J, Clement J, Khorshidi F, Poljak A, Jayasena T, et al. Role of nicotinamide adenine dinucleotide and related precursors as therapeutic targets for age-related degenerative diseases: rationale, biochemistry, pharmacokinetics, and outcomes. *Antioxidants & redox signaling*. 2019;30(2):251-94.
18. Demarest TG, Truong GTD, Lovett J, Mohanty JG, Mattison JA, Mattson MP, et al. Assessment of NAD<sup>+</sup> metabolism in human cell cultures, erythrocytes, cerebrospinal fluid and primate skeletal muscle. *Analytical Biochemistry*. 2019;572:1-8.
19. Johnson S, Imai S-I. NAD (+) biosynthesis, aging, and disease. *F1000Res*. 2018;7:132-.
20. Imai S-i, Guarente L. NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol*. 2014;24(8):464-71.
21. Sultani G, Samsudeen AF, Osborne B, Turner N. NAD<sup>+</sup>: A key metabolic regulator with great therapeutic potential. *Journal of Neuroendocrinology*. 2017;29(10):e12508.
22. Bockwoldt M, Houry D, Niere M, Gossmann TI, Reinartz I, Schug A, et al. Identification of evolutionary and kinetic drivers of NAD-dependent signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(32):15957-66.
23. Muñoz Fernández P. *Estudio de la localización de la proteína CD38 en microdominios de membrana del linfocito T: función en la sinapsis inmunológica*. 2007.
24. Dai Z, Zhang X-N, Nasertorabi F, Cheng Q, Pei H, Louie SG, et al. Facile chemoenzymatic synthesis of a novel stable mimic of NAD<sup>+</sup>. *Chemical science*. 2018;9(44):8337-42.
25. Camacho-Pereira J, Tarragó MG, Chini CCS, Nin V, Escande C, Warner GM, et al. CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab*. 2016;23(6):1127-39.
26. Schultz MB, Sinclair DA. Why NAD<sup>+</sup> Declines during Aging: It's Destroyed. *Cell Metab*. 2016;23(6):965-6. nvejecimiento
27. Clement J, Wong M, Poljak A, Sachdev P, Braidy N. The Plasma NAD(+) Metabolome Is Dysregulated in "Normal" Aging. *Rejuvenation Res*. 2019;22(2):121-30.
28. Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(8):1666-75.
29. Connell NJ, Houtkooper RH, Schrauwen P. NAD<sup>+</sup> metabolism as a target for metabolic health: have we found the silver bullet? *Diabetologia*. 2019;62(6):888-99.
30. Imai S-i, Guarente L. It takes two to tango: NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging/longevity control. *npj Aging and Mechanisms of Disease*. 2016;2(1):1-6.

31. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:253-95.
32. Verdin E. NAD<sup>+</sup> in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science.* 2015;350(6265):1208-13.
33. Chaleckis R, Murakami I, Takada J, Kondoh H, Yanagida M. Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(16):4252-9.
34. Okabe K, Yaku K, Tobe K, Nakagawa T. Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):34-.
35. Elhassan YS, Kluckova K, Fletcher RS, Schmidt MS, Garten A, Doig CL, et al. Nicotinamide Riboside Augments the Aged Human Skeletal Muscle NAD(+) Metabolome and Induces Transcriptomic and Anti-inflammatory Signatures. *Cell Rep.* 2019;28(7):1717-28.e6.
36. Felipe Salech M, Rafael Jara L, Luis Michea A. Cambios fisiológicos asociados al envejecimiento. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2012;23(1):19-29.
37. Chini CCS, Tarragó MG, Chini EN. NAD and the aging process: Role in life, death and everything in between. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;455:62-74.
38. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
39. Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, Mattson MP, Cader MZ, Bohr VA, et al. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms. *Trends in neurosciences.* 2017;40(3):151-66.
40. Stein LR, Imai S-i. Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging. *EMBO J.* 2014;33(12):1321-40.
41. Luu J, Palczewski K. Human aging and disease: Lessons from age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018;115(12):2866-72.
42. Croft T, Venkatakrisnan P, Lin S-J. NAD<sup>+</sup> metabolism and regulation: Lessons from yeast. *Biomolecules.* 2020;10(2):330.
43. Moreno TH. Teorías actuales de envejecimiento. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas.* 1984;13(3):33-8.
44. Cardellach F, Miró O. Papel de la mitocondria en el proceso de envejecimiento. *Clinica e Investigación en Arteriosclerosis.* 2004;16(1):29-37.
45. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S-i. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 2011;14(4):528-36.
46. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Cantó C, et al. The NAD<sup>+</sup>/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell.* 2013;154(2):430-41.
47. Massudi H, Grant R, Braidy N, Guest J, Farnsworth B, Guillemin GJ. Age-associated changes in oxidative stress and NAD<sup>+</sup> metabolism in human tissue. *PLoS One.* 2012;7(7):e42357-e.
48. Cantó C, Menzies Keir J, Auwerx J. NAD<sup>+</sup> Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab.* 2015;22(1):31-53.
49. Grant R, Berg J, Mestayer R, Braidy N, Bennett J, Broom S, et al. A Pilot Study Investigating Changes in the Human Plasma and Urine NAD<sup>+</sup> Metabolome During a 6 Hour Intravenous Infusion of NAD. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:257-.
50. *Pediatría. CdMdlAEd. Nicotinamida Pediamécum. Edición 2015. ISSN 2531-2464.2016* [Available from: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/nicotinamida>.

51. Yoshino J, Baur JA, Imai S-I. NAD(+) Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metab.* 2018;27(3):513-28.
52. Martens CR, Denman BA, Mazzo MR, Armstrong ML, Reisdorph N, McQueen MB, et al. Chronic nicotinamide riboside supplementation is well-tolerated and elevates NAD(+) in healthy middle-aged and older adults. *Nat Commun.* 2018;9(1):1286.
53. Zhou C-C, Yang X, Hua X, Liu J, Fan M-B, Li G-Q, et al. Hepatic NAD(+) deficiency as a therapeutic target for non-alcoholic fatty liver disease in ageing. *Br J Pharmacol.* 2016;173(15):2352-68.
54. Lin J, Pan Y, Wang J. NAD+ and its precursors in human longevity. *Quantitative Biology.* 2015;3(4):193-8.
55. Remie CME, Roumans KHM, Moonen MPB, Connell NJ, Havekes B, Mevenkamp J, et al. Nicotinamide riboside supplementation alters body composition and skeletal muscle acetylcarnitine concentrations in healthy obese humans. *Am J Clin Nutr.* 2020.
56. North BJ, Rosenberg MA, Jeganathan KB, Hafner AV, Michan S, Dai J, et al. SIRT2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan. *EMBO J.* 2014;33(13):1438-53.
57. Zhang H, Ryu D, Wu Y, Gariani K, Wang X, Luan P, et al. NAD+ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science.* 2016;352(6292):1436-43.
58. Mills KF, Yoshida S, Stein LR, Grozio A, Kubota S, Sasaki Y, et al. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice. *Cell Metab.* 2016;24(6):795-806.
59. de Picciotto NE, Gano LB, Johnson LC, Martens CR, Sindler AL, Mills KF, et al. Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses vascular dysfunction and oxidative stress with aging in mice. *Aging cell.* 2016;15(3):522-30.
60. Babault N, Allali-Hassani A, Li F, Fan J, Yue A, Ju K, et al. Discovery of Bisubstrate Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT). *Journal of Medicinal Chemistry.* 2018;61(4):1541-51.