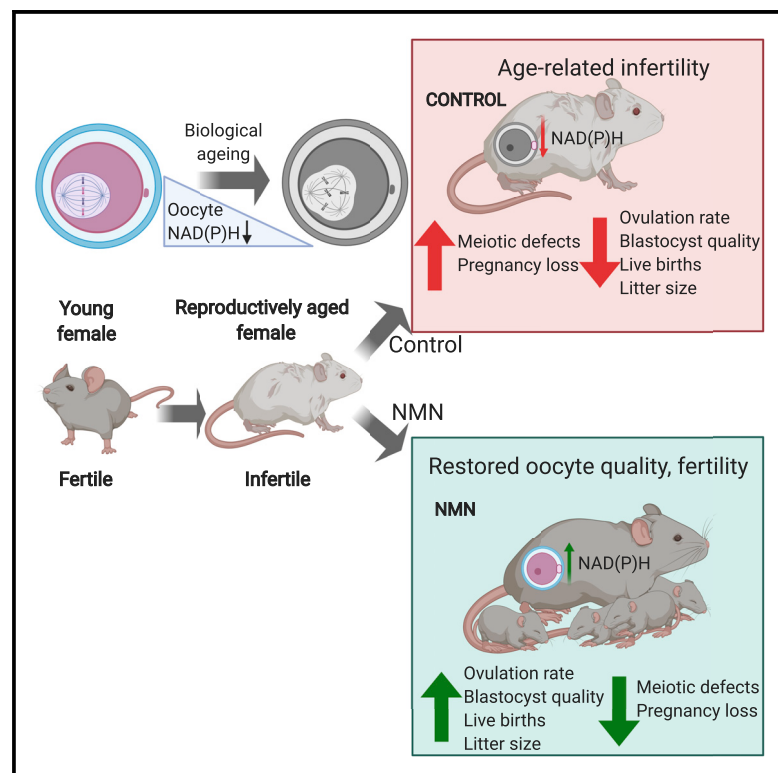


Cell Reports

NAD⁺ Repletion rescata la fertilidad femenina durante el envejecimiento reproductivo

Gráficamente abstracto



Autores

Michael J. Bertoldo, Dave R. Listijono, Wing-Hong Jonathan Ho, ..., David A. Sinclair, Hayden A. Homer, Lindsay E. Wu

Correspondencia

david_sinclair@hms.harvard.edu (DAS), h.homer@uq.edu.au (HAH), lindsay.wu@unsw.edu.au (LEW)

En breve

La disminución de la calidad de los ovocitos se considera una característica irreversible del envejecimiento y limita la tasa de fertilidad humana. Bertoldo et al. muestran que revertir una disminución dependiente de la edad en NAD (P) H restaura la calidad de los ovocitos, el desarrollo del embrión y la fertilidad funcional en ratones de edad avanzada. Estos hallazgos pueden ser relevantes para la medicina reproductiva.

Reflejos

- D La disminución de NAD(P)H se asocia con la disfunción de los ovocitos durante el envejecimiento reproductivo
- D La calidad y la fertilidad de los ovocitos se pueden restaurar mediante el tratamiento con NMN en ratones de edad avanzada
- D La suplementación de medios embrionarios con NMN mejora los hitos del desarrollo
- D La sobreexpresión de SIRT2 imita los beneficios de NMN pero es poco probable que medie sus efectos



Bertoldo et al., 2020, Informes de celda 30, 1670-1681
18 de febrero de 2020 © 2020 El(los) autor(es). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.058>

CellPress

NAD⁺ Repletion rescata la fertilidad femenina durante el envejecimiento reproductivo

Michael J. Bertoldo,^{1,2,13} Dave R. Listijono,^{1,2,13} Wing-Hong Jonathan Ho,^{1,2,13} Angélica H. Riepsamen,² Dale M. Goss,¹ Dulama Richani,² Xing L. Jin,³ Saaba Mahbub,⁴ Jared M. Campbell,⁴ Abbas Habibalahi,⁴ Wei-Guo Nicolás Loh,² Neil A. Youngson,¹ Jayanthi Maniam,¹ Ashley SA Wong,¹ Kaisa Selesniemi,^{5,6} Sonia Bustamante,⁷ Catalina Li,¹ Yiqing Zhao,² María B. Marinova,² Lynn-Jee Kim,¹ Laurín Lau,² Rachael M. Wu,⁸ A. Stefanie Mikolaizak,⁹ Toshiyuki Araki,¹⁰ David G. Le Couteur,¹¹ Nigel Turner,¹ Margaret J. Morris,¹ Kirsty A. Walters,² Ewa Goldys,⁴ Christopher O'Neill,³ Roberto B. Gilchrist,² David A. Sinclair,^{1,5,14,*} Hayden A. Homero,^{2,12,14,*} y Lindsay E. Wu^{1,14,15,*}

¹Facultad de Ciencias Médicas, UNSW Sídney, Sídney, NSW, Australia

²Escuela de Salud de la Mujer y el Niño, UNSW Sydney, Sydney, NSW, Australia

³Unidad de Reproducción Humana, Instituto Kolling, Escuela de Medicina de Sydney, Universidad de Sydney, St Leonards, NSW, Australia

⁴Centro de Excelencia ARC en Biofotónica a Nanoescala, UNSW Sydney, NSW, Australia

⁵Laboratorios Paul F. Glenn para los Mecanismos Biológicos del Envejecimiento, Facultad de Medicina de Harvard, Boston MA, EE. UU.

⁶Jumpstart Fertility Pty Ltd., Sídney, NSW, Australia

⁷Instalación de Espectrometría de Masas Bioanalítica, Centro Analítico Mark Wainwright, UNSW Sídney, Sídney, NSW, Australia

⁸Graduate Entry Medical School, Universidad de Limerick, Limerick, República de Irlanda

⁹Investigación de neurociencias de Australia, Randwick, NSW, Australia

¹⁰Departamento de Investigación del Sistema Nervioso Periférico, Instituto Nacional de Neurociencia, Centro Nacional de Neurología y Psiquiatría, Tokio, Japón

¹¹Instituto de Investigación Médica ANZAC, Universidad de Sydney, Concord, NSW, Australia

¹²Laboratorio de Biología de Oocitos Christopher Chen, Centro de Investigación Clínica de la Universidad de Queensland, Royal Brisbane & Women's Hospital, Herston, QLD, Australia

¹³Estos autores contribuyeron igualmente

¹⁴Estos autores contribuyeron igualmente

¹⁵Contacto principal

* Correspondencia: david_sinclair@hms.harvard.edu (DAS), h.homer@uq.edu.au (JAJA), lindsay.wu@unsw.edu.au (LEW)
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.058>

RESUMEN

El envejecimiento reproductivo en las hembras de los mamíferos es un proceso irreversible asociado con la disminución de la calidad de los ovocitos, que es el factor limitante de la tasa de fertilidad. Aquí, mostramos que esta pérdida de la calidad del ovocito con la edad acompaña a la disminución de los niveles del destacado cofactor metabólico nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). Tratamiento con NAD⁺ El precursor metabólico mononucleótido de nicotinamida (NMN) rejuvenece la calidad de los ovocitos en animales de edad avanzada, lo que conduce a la restauración de la fertilidad, y esto puede recapitularse mediante la sobreexpresión transgénica de NAD⁺-desacilasa SIRT2 dependiente, aunque la eliminación de esta enzima no afecta la calidad del ovocito. Estos beneficios de NMN se extienden al embrión en desarrollo, donde la suplementación revierte el efecto adverso de la edad materna en los hitos del desarrollo. Estos hallazgos sugieren que la restauración de NAD en la vejez+ niveles representa una oportunidad para rescatar la función reproductiva femenina en los mamíferos.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la edad materna y la subsiguiente infertilidad se han convertido rápidamente en un desafío importante para la planificación familiar, como resultado

del declive irreversible de la fertilidad femenina en los mamíferos. El factor limitante para el éxito del embarazo es la calidad de los ovocitos, que disminuye significativamente desde finales de la tercera década de vida en humanos (De Vos et al., 2014; Sauer, 2015). A pesar de la enorme demanda, no existen estrategias clínicamente viables para preservar o rejuvenecer la calidad del ovocito durante el envejecimiento, que se define por la capacidad del ovocito para soportar la maduración meiótica, la fertilización y el posterior desarrollo embrionario. Un tratamiento farmacológico no invasivo para mantener o restaurar la calidad de los ovocitos durante el envejecimiento aliviaría una barrera limitante de la tasa de embarazo con el aumento de la edad que ha impulsado la demanda de tecnologías de reproducción asistida (TRA) como *in vitro* La fecundación in vitro (FIV), que es invasiva, conlleva riesgos para la salud (Kumar et al., 2011), es costoso y tiene una tasa de éxito limitada.

Aunque los tejidos somáticos experimentan una regeneración continua a través de la renovación de una población de células madre precursoras residentes que se autorrenuevan, los ovocitos en el ovario se depositan durante *en el útero* desarrollo en humanos, donde forman un grupo finito que no se renueva a sí mismo. Por lo tanto, los ovocitos son muy susceptibles a la disfunción relacionada con la edad. La base molecular de la disminución de la calidad de los ovocitos con el avance de la edad implica la inestabilidad del genoma, la bioenergética mitocondrial reducida, el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las alteraciones durante la segregación cromosómica meiótica debido a la función comprometida del sistema de vigilancia del punto de control del ensamblaje del huso (SAC) (Franasiak et al., 2014; Greaney et al., 2018). La causa molecular de la mala segregación cromosómica en los ovocitos con la edad avanzada aún se desconoce y, como resultado, no hay



estrategias farmacológicas para corregir este problema. Comprender la base molecular o metabólica de este defecto podría conducir a terapias que podrían mantener o incluso rescatar la fertilidad femenina a medida que avanza la edad.

El metabolito nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺/NADH) es un destacado cofactor redox y sustrato enzimático que es esencial para el metabolismo energético, la reparación del ADN y la homeostasis epigenética. Los niveles de este cofactor esencial disminuyen con la edad en los tejidos somáticos (Massudi et al., 2012), y revirtiendo esta disminución mediante el tratamiento con precursores metabólicos para NAD⁺ ha ganado atención como un tratamiento para mantener la salud en la vejez (Mills et al., 2016; Rajman et al., 2018). Aquí, demostramos que la autofluorescencia de NADH y su forma fosforilada NADPH disminuye en los ovocitos con la edad, y delineamos un papel para NAD⁺ y un papel potencial para la NAD⁺-que consumen la enzima SIRT2 como mediadores de la fertilidad que están abiertos a la intervención farmacológica.

RESULTADOS

Intentamos determinar si NAD⁺ disminuyó en los ovocitos con la edad, lo que contribuyó a la infertilidad y a la disminución de la calidad de los ovocitos, y si esto podría revertirse mediante el tratamiento con NAD⁺ mononucleótido precursor de nicotinamida (NMN) (Yoshino et al., 2011). Para abordar estas preguntas, utilizamos ratones, cuya fertilidad comienza a disminuir alrededor de los 8 meses de edad debido a defectos en los ovocitos que son similares a los de los humanos (Greaney et al., 2018). Debido a los desafíos bioanalíticos de medir NAD⁺ niveles en ovocitos individuales, utilizamos técnicas de imagen de microscopía hiperespectral que explotan la autofluorescencia de NADH y NADPH (Dong et al., 2019; Kolenc y Quinn, 2019). Hembras de 12 meses de edad fueron tratadas con NMN en agua potable (2 g/L) durante 4 semanas, luego de lo cual se recuperaron ovocitos maduros en metafase II (MII) y se sometieron a imágenes de microscopía multiespectral de autofluorescencia para determinar la abundancia relativa de ovocitos nativos. fluoróforos (Figura 1A). De acuerdo con nuestra hipótesis, encontramos que los niveles de NAD(P)H disminuyeron en los ovocitos de animales viejos, en comparación con animales jóvenes (de 4 a 5 semanas de edad), y el tratamiento con NMN aumentó los niveles de NAD(P)H en ovocitos de animales viejos. animales (Figura 1B). A continuación, buscamos determinar si esta tendencia se produjo en todo el ovario, en lugar de solo en los ovocitos. Usando espectrometría de masas, no observamos una disminución en los niveles de NAD(H) de ovario completo con la edad (Figura 1C), lo que sugiere que el ovocito representa una subunidad especialmente vulnerable del ovario que está sujeta a una disminución de NAD relacionada con la edad., en contraste con el estroma circundante que constituye la mayor parte del tejido ovárico. De acuerdo con los datos de imágenes hiperespectrales de ovocitos individuales, el tratamiento con NMN aumentó la NAD⁺ niveles en todo el ovario, como se esperaría después de un parto sistémico (Figura 1D).

Para probar si se aborda la disminución relacionada con la edad en el NAD de los ovocitos+ los niveles alterarían la calidad de los ovocitos, tratamos hembras de 14 meses con NMN en agua potable (2 g/L) durante 4 semanas, mientras que los animales de control se mantuvieron en la misma agua potable en ausencia de NMN. Los efectos de esta intervención sobre la calidad de los ovocitos se evaluaron en ovocitos en etapa de vesícula germinal (GV) recolectados de los ovarios de animales estimulados con gonadotropina sérica (PMSG) de yegua preñada, que maduraron

in vitro a la etapa MII, e inmunoteñidos para evaluar la estructura del huso y la alineación cromosómica. El tratamiento NMN rescató notablemente el montaje del husillo (Figura 2A). El rendimiento de ovocitos también aumentó en animales de edad avanzada después de la hiperestimulación ovárica de ratones C57BL/6J^{Ausb} con PMSG y gonadotropina coriónica humana (hCG) para obtener ovocitos MII del oviducto y la hiperestimulación de ratones albinos suizos con PMSG solo para obtener complejos de ovocitos de cúmulo en etapa GV (AOC) directamente de ovarios perforados (Figuras 2B y 2C). Para probar aún más la importancia de NAD⁺ biosíntesis, obtuvimos cepas de ratones transgénicos que sobreexpresan constitutivamente el NAD⁺ enzimas biosintéticas NMNAT1 o NMNAT3 (Figuras 2D y 2E; Figura S1; Yahata et al., 2009), que se localizan en el núcleo o en las mitocondrias, respectivamente (Berger et al., 2005). Estos animales tenían niveles elevados de NMNAT1 y NMNAT3 en el tejido ovárico, aunque estas proteínas no pudieron detectarse en los ovocitos mediante transferencia Western, muy probablemente debido a las bajas concentraciones de proteínas que se obtuvieron de los ovocitos relevantes para otros tejidos. Al igual que con el tratamiento NMN, de 12 a 14 meses de edad *Nmnat1^{Tg/+}* animales, pero no *Nmnat3^{Tg/+}* animales, produjeron más ovocitos que sus compañeros de camada de tipo salvaje (Figuras 2D y 2E), lo que sugiere que la localización subcelular de NAD⁺ la biosíntesis es importante para la función folicular y del ovocito. Para probar el requisito de NAD⁺

biosíntesis en la maduración meiótica, tratamos ovocitos en etapa GV con FK866, un inhibidor de la NAD⁺ enzima biosintética NAMPT (Hasmann y Schemainda, 2003), y evaluó la progresión meiótica (Figura S2). Tanto la descomposición de vesículas germinales (GVBD) como la extrusión de cuerpos polares (PBE) se ralentizaron con el tratamiento con FK866, de acuerdo con la idea de que NAD⁺ la síntesis es esencial para la función del ovocito.

A continuación, buscamos determinar si el tratamiento con NMN en la vejez dio como resultado ovocitos con un potencial de desarrollo mejorado. Los animales de 12 meses de edad se trataron con NMN durante 4 semanas (2 g/L, agua de bebida) y se recogieron ovocitos MII de los oviductos después de la estimulación con PMSG y hCG. Los ovocitos de animales de edad avanzada (12 meses) tratados con NMN tenían un diámetro mayor (Figura 2F), que puede ser relevante dado que los ovocitos con diámetros más pequeños se asocian con peores resultados después de la FIV (Atzmon et al., 2017; Marquard et al., 2011). Una cohorte separada de ovocitos se sometió a FIV y, en el día 6, se evaluó la proporción de embriones que alcanzaron la formación de blastocistos (Figura 2G), con una tendencia hacia mejores tasas de formación de blastocistos. Luego tratamos de determinar *in vivo* El tratamiento con NMN alteraría el desarrollo subsiguiente de la masa celular interna de los blastocistos, lo que es altamente predictivo del éxito del embarazo. Carril y Gardner, 1997). Se trataron ratones de doce meses de edad con NMN en agua potable durante 2, 7, 14 o 28 días, y los ovocitos se sometieron a FIV. En el día 6, los embriones se sometieron a tinción diferencial de la masa celular interna. La duración del tratamiento con NMN en animales se correlacionó con mejoras en el tamaño de la masa celular interna (Figura 2H), y para confirmar que esto se tradujo en mejores resultados de fertilidad, tratamos una cohorte de animales de 13 meses con dos dosis diferentes de NMN (agua potable, 0,5 y 2 g/L) durante 4 semanas antes de la introducción de un macho de fertilidad comprobada. Luego se evaluó el rendimiento reproductivo determinado por la gestación, los nacidos vivos y el tamaño de la camada durante las siguientes 9 semanas, desde los 14 a los 16 meses de edad (Figuras 2I-2M). El tratamiento con NMN mejoró el tiempo hasta el primer nacido vivo (Figura 2J)

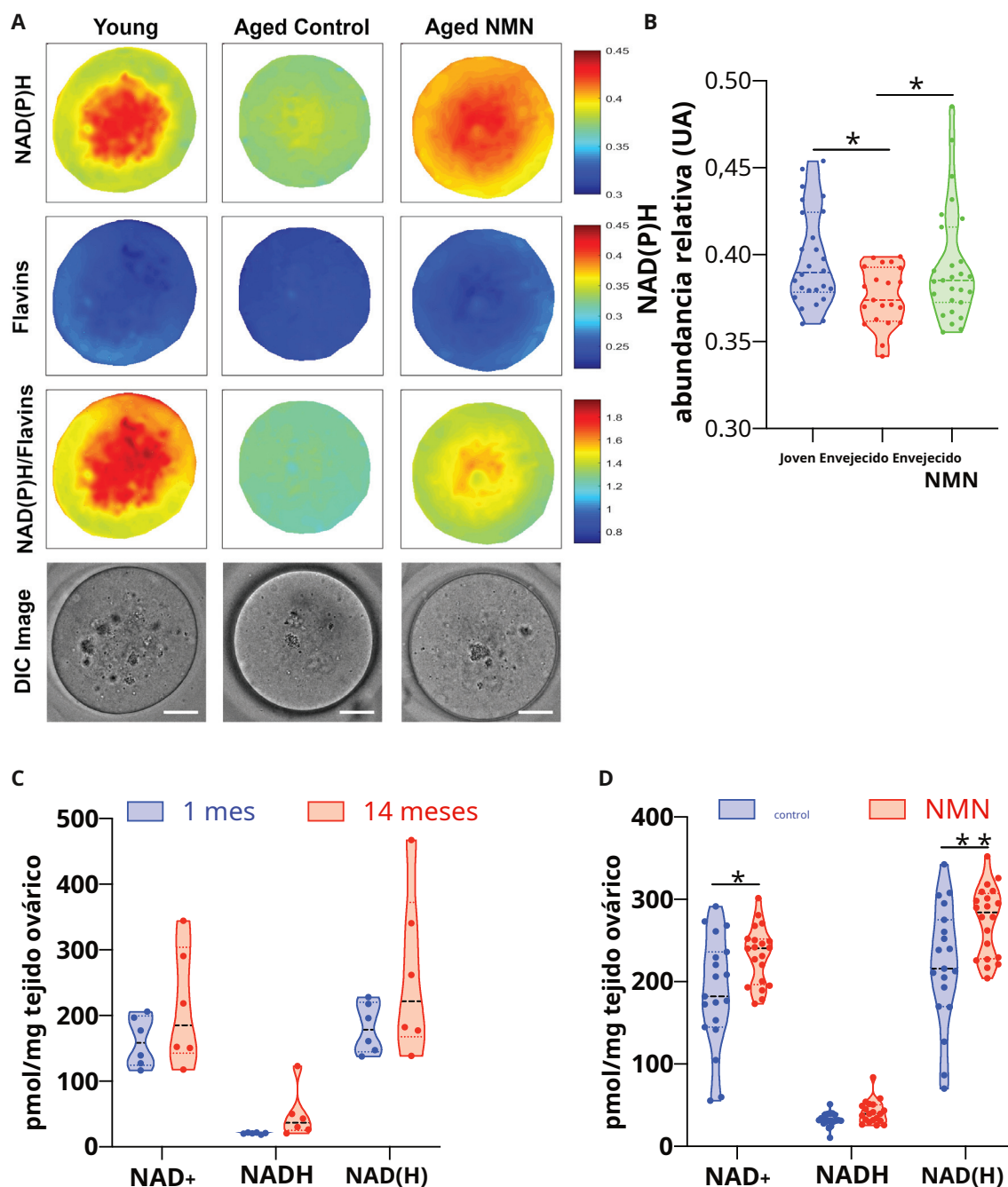


Figura 1. Ovocito NAD⁺. Los niveles disminuyen con la edad y aumentan con el tratamiento con NMN

(A y B) Imágenes multispectrales (A) para determinar el contenido de NAD(P)H en ovocitos de ratones jóvenes (de 4 a 5 semanas de edad) o envejecidos (de 12 meses) tratados con NMN (agua potable, 2 g/L, 4 semanas) (la barra de escala es 20 micrometros), cuantificado en (B) (ANOVA unidireccional 1,454 (2, 71), *p = 0,0165, 0,0287 mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett, n = 21-27 ovocitos por grupo).

(C y D) La espectrometría de masas de todo el ovario (C) no muestra cambios en los niveles de NAD(H) entre las edades de 1 y 14 meses (n = 6 ratones por grupo); sin embargo, (D) NMN aumentó el NAD(H) ovárico en ratones de 14 meses (1 h después de 400 mg/kg de alimentación por sonda oral, *p = 0,0123, **p = 0,0072, prueba t de dos colas, n = 20 ratones por grupo).

y la proporción general de animales que lograron nacer vivos durante la prueba de reproducción (Figura 2K), aunque sorprendentemente esto ocurrió con la dosis más baja de NMN (0,5 g/l), lo que sugiere que los experimentos anteriores se realizaron con una dosis que benefició la calidad de los ovocitos pero que puede haber afectado negativamente a otros aspectos de la fertilidad. Esta

podría estar relacionado con un límite superior a la tolerabilidad de NMN o la formación aumentada del producto de degradación de NMN nicotinamida, que es un inhibidor de la sirtuina (Bitterman et al., 2002). Estos datos de enfoques farmacológicos y genéticos ortogonales muestran que el aumento de NAD⁺ mejora la tasa de ovulación, ovocito

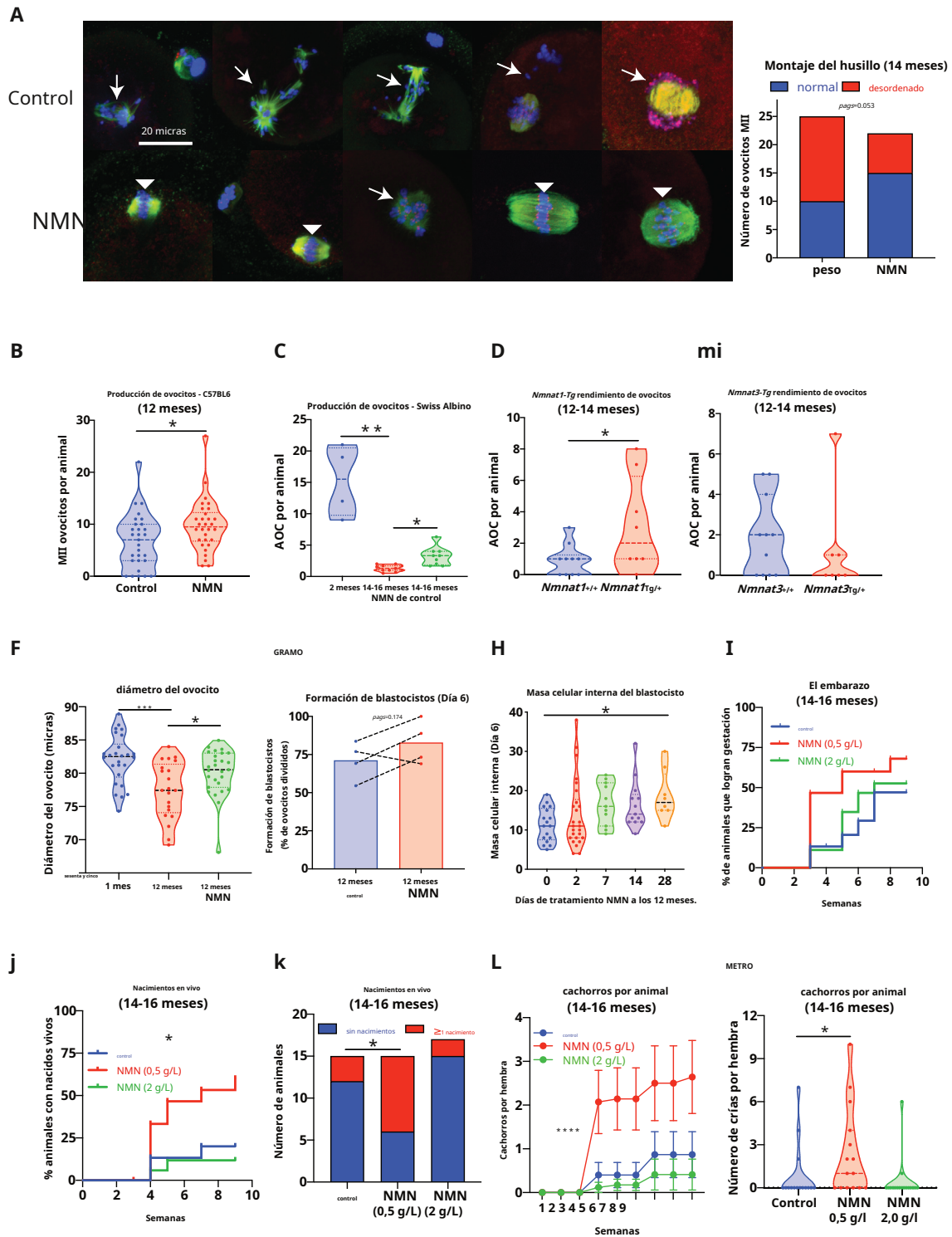


Figura 2. El tratamiento con NMN restaura la calidad de los ovocitos, la dinámica de los folículos, el desarrollo embrionario y las tasas de nacidos vivos

(A) El tratamiento con NMN (agua potable, 2 g/L, 4 semanas) con NMN desde los 14 meses restaura el ensamblaje del huso en ovocitos inmunoteñidos (B-tubulina en verde, Hoechst para ADN en azul, cinetocoros en rojo, $p = 0,0503$ mediante la prueba exacta de Fisher, $n = 23-25$ por grupo). Los husos desordenados con cromosomas rezagados se indican mediante flechas, y los husos bipolares normales en forma de barril con ADN alineado a lo largo de la placa metafásica se indican mediante puntas de flecha.

(B y C) Producción de ovocitos después de la estimulación ovárica en (B) ratones C57BL/6J/Ausb envejecidos (12 meses de edad) ($*p = 0,0211$, prueba t de dos colas, $n = 29-30$ animales por grupo) y (C) ratones albinos suizos de 14 a 16 meses de edad (Kruskal-Wallis 16,31, $***p = 0,0004$, $*p = 0,0295$ según la prueba de comparación múltiple de Dunnett, $n = 4-11$ por grupo).

(la leyenda continúa en la página siguiente)

calidad y tasas generales de nacidos vivos en ratones hembra de edad avanzada, aunque apuntan a un rango óptimo de dosificación.

Dado el potencial de traducción clínica de este trabajo, era importante evaluar si este tratamiento afectaría negativamente la salud o el desarrollo de la descendencia después de la exposición materna a NMN. Las crías de una cohorte separada de animales mantenidos con la dosis más alta de NMN (2 g/L) antes del apareamiento, durante el embarazo y durante la lactancia se mantuvieron con comida normal o se desafiaron con alimentación rica en grasas para determinar su salud y desarrollo. Los animales fueron evaluados por cambios fisiológicos y de comportamiento (Figura S3). No hubo cambios por la exposición materna a NMN, excepto por un pequeño aumento en la masa corporal magra del tratamiento materno con NMN (Figura S3D). Estos datos están en línea con trabajos recientes (Oreja et al., 2019) sugiriendo que la administración de la NAD⁺ precursor ribósido de nicotinamida (NR) durante la lactancia no es dañino y puede mejorar la salud de las crías.

Luego buscamos determinar el mecanismo que mediaba estos beneficios. Un candidato que planteamos como hipótesis para este papel es el NAD⁺-desacilasa SIRT2 dependiente. Anteriormente mostramos que SIRT2 estabiliza la proteína SAC BubR1 (Norte et al., 2014), que es fundamental para la progresión meiótica (Homero et al., 2009), la fijación del cinetocoro y la segregación cromosómica en los ovocitos (Qiu et al., 2018; Touati et al., 2015; Zhang et al., 2014). Los niveles de BubR1 disminuyen en el tejido reproductivo del ratón (Norte et al., 2014) y ovocitos humanos con edad avanzada (Riris et al., 2014). SIRT2 mantiene la estabilidad del genoma a través de la desacetilación de Cdc20 y Cdh1 necesarios para mantener la actividad del complejo promotor de la anafase (Kim et al., 2011), que es un regulador esencial de los ovocitos (Homero, 2013; Jin et al., 2010).

Para probar si SIRT2 podría recapitular los beneficios del tratamiento con NMN, obtuvimos una cepa de *Sirt2^{Tg/+}* ratones (Norte et al., 2014) que sobreexpresan SIRT2 en todos los tejidos, incluidos los ovocitos (Figura S4A), y evaluó la calidad de los ovocitos a la edad de 14 meses. Al igual que con nuestros experimentos anteriores, los ovocitos se inmunotefieron para evaluar la estructura del huso y la alineación cromosómica. Como era de esperar, más del 70% de los ovocitos de tipo salvaje en edad reproductiva (*Sirt2^{+/+}*) los animales tenían husos sorprendentemente desordenados y cromosomas mal alineados (Figuras 3A y 3B), mientras que el 80% de los ovocitos de la transgénica SIRT2 (*Sirt2^{Tg/+}*) los compañeros de camada exhibieron husos bipolares normales en forma de barril y cromosomas bien alineados. Después de la estimulación con PMSG, se obtuvo el doble de AOC de ancianos

Sirt2^{Tg/+} ovarios en comparación con *Sirt2^{+/+}* compañeros de camada (figura 3C). Dada la importancia de la integridad del huso y la alineación de los cromosomas para la segregación cromosómica, a continuación probamos si los ovocitos de *Sirt2^{Tg/+}* los animales podrían ser menos propensos a la aneuploidía, una característica patogénica de los ovocitos de mala calidad de las hembras de edad avanzada. Como era de esperar, las tasas de aneuploidía aumentaron con la edad, del 15 % a los 3 meses de edad al 43 % a los 16 meses de edad en *Sirt2^{+/+}* ovocitos de tipo salvaje, mientras que en ovocitos de edad *Sirt2^{Tg/+}* compañeros de camada, la incidencia fue del 20%, comparable a las hembras jóvenes (figura 3D). El estrés oxidativo es un factor clave del envejecimiento de los ovocitos y la infertilidad femenina (Agarwal et al., 2012). SIRT2 desacetila y mantiene la actividad de la enzima G6PD de la vía de las pentosas fosfato (Wang et al., 2014), que regenera el antioxidante glutatión a través de su producción de NADPH. En comparación con los ovocitos de tipo salvaje, *Sirt2^{Tg/+}* Los ovocitos de animales viejos mostraron niveles marcadamente reducidos de ROS, según lo determinado por la tinción con el tinte fluorescente H sensible a ROS:DCFDA bajo ambos jóvenes (5 a 6 meses de edad) indiscutible (Figuras 3E y 3F) y H₂O₂-condiciones desafiadas (Figuras S4D y S4E). De acuerdo con estos datos y nuestra hipótesis, observamos una mayor actividad de la enzima G6PD en *Sirt2^{Tg/+}* ovocitos (figura 3GRAMO).

Dadas las características mejoradas de los ovocitos de edad *Sirt2^{Tg/+}* animales, buscamos determinar si esto se traduciría en una mejora de la fertilidad. A partir de los 15 meses de edad, los animales se sometieron a pruebas de reproducción para determinar las tasas de preñez. De acuerdo con una fertilidad muy baja a esta edad, solo el 25% de los de tipo salvaje *Sirt2^{+/+}* las hembras lograron un embarazo en 5 rondas de apareamiento, mientras que esta tasa se triplicó al 75% en *Sirt2^{Tg/+}* hembras (figura 3h). Estos datos demuestran que el NAD⁺-La desacilasa dependiente de SIRT2 es suficiente para mantener la función ovárica y la fertilidad femenina durante el envejecimiento.

Aunque estos datos sugirieron que SIRT2 fue suficiente para recapitular los beneficios de NMN para la fertilidad, luego buscamos determinar si SIRT2 también era obligatorio para mantener la función normal de los ovocitos mediante el uso de *Sirt2^{-/-}* animales noqueados. Oocitos de todo el cuerpo *Sirt2^{-/-}*. Los ratones knockout a la edad de 5 a 6 meses mostraron un ensamblaje y maduración del huso normales (figura 3I), lo que indica que a una edad más temprana en la que NAD⁺ está repleto, SIRT2 no es esencial para el montaje preciso del husillo o que existe redundancia en el papel de SIRT2 con otros factores aún por identificar. Estos *in vivo* resultados de *Sirt2^{-/-}* los animales knockout contrastan con *in vitro* estudios (Qiu et al., 2018; Riepsamen et al., 2015; Zhang et al., 2014). En total,

(D y E) Los ratones transgénicos envejecidos (de 12 a 14 meses de edad) que sobreexpresan NMNAT1 han aumentado la producción de ovocitos (*p = 0,0416, prueba t de dos colas, n = 8–10 por grupo) (D) en comparación a transgénicos que sobreexpresan NMNAT3 (n = 7–11) (E).

(F) Diámetro del ovocito después del tratamiento con NMN (2 g/L, agua potable, 4 semanas) en hembras C57BL/6 de edad (12 meses) o jóvenes (4 a 6 semanas) (F(2, 71) = 8,504, ***p = 0,0002, *p = 0,0332 por la prueba de comparación múltiple de Dunnett, n = 21–27 ovocitos por grupo).

(G) En una cohorte paralela, se usaron ovocitos para la FIV, con formación de blastocistos en el día 6 del desarrollo del embrión (cada punto de datos son datos acumulativos de un experimento independiente).

(H) Hembras C57BL/6 de 12 meses de edad fueron tratadas por los tiempos indicados con NMN en agua de bebida (2 g/L), y los ovocitos MII fueron sometidos a FIV. En el día 6, se evaluó la masa celular interna (Kruskal-Wallis 11,93, *p = 0,0337 mediante la prueba de comparación múltiple de Dunn, n = 8–26 ovocitos por grupo). Hembras C57BL/6 de 13 meses sin tratamiento previo (n = 15–17 por grupo) fueron tratadas durante 4 semanas con NMN en agua potable en dos dosis (0,5 y 2 g/L), después de lo cual se introdujo un macho y se reprodujo. se evaluó el rendimiento durante las próximas 9 semanas.

(I–M) El rendimiento reproductivo se evaluó mediante (I) el tiempo acumulado hasta la preñez, (J) el tiempo acumulado hasta el nacimiento vivo (prueba de rango logarítmico, **p = 0,0059),

(K) la proporción general que logró un nacimiento vivo (prueba exacta de Fisher). *p = 0,0253 ctrl frente a 0,5 g/L NMN), (L) número acumulado de crías nacidas a lo largo del tiempo (ANOVA de medidas repetidas, NMN F(2, 43) = 4,925, p = 0,0119, comparación múltiple de Dunnett ctrl frente a NMN 0,5, ****p < 0,0001, las barras de error muestran SEM) y (M) número total de crías por hembra (Kruskal-Wallis 9,220, p = 0,0100, comparación múltiple de Dunn, *p = 0,0491 ctrl frente a 0,5 g/L NMN).

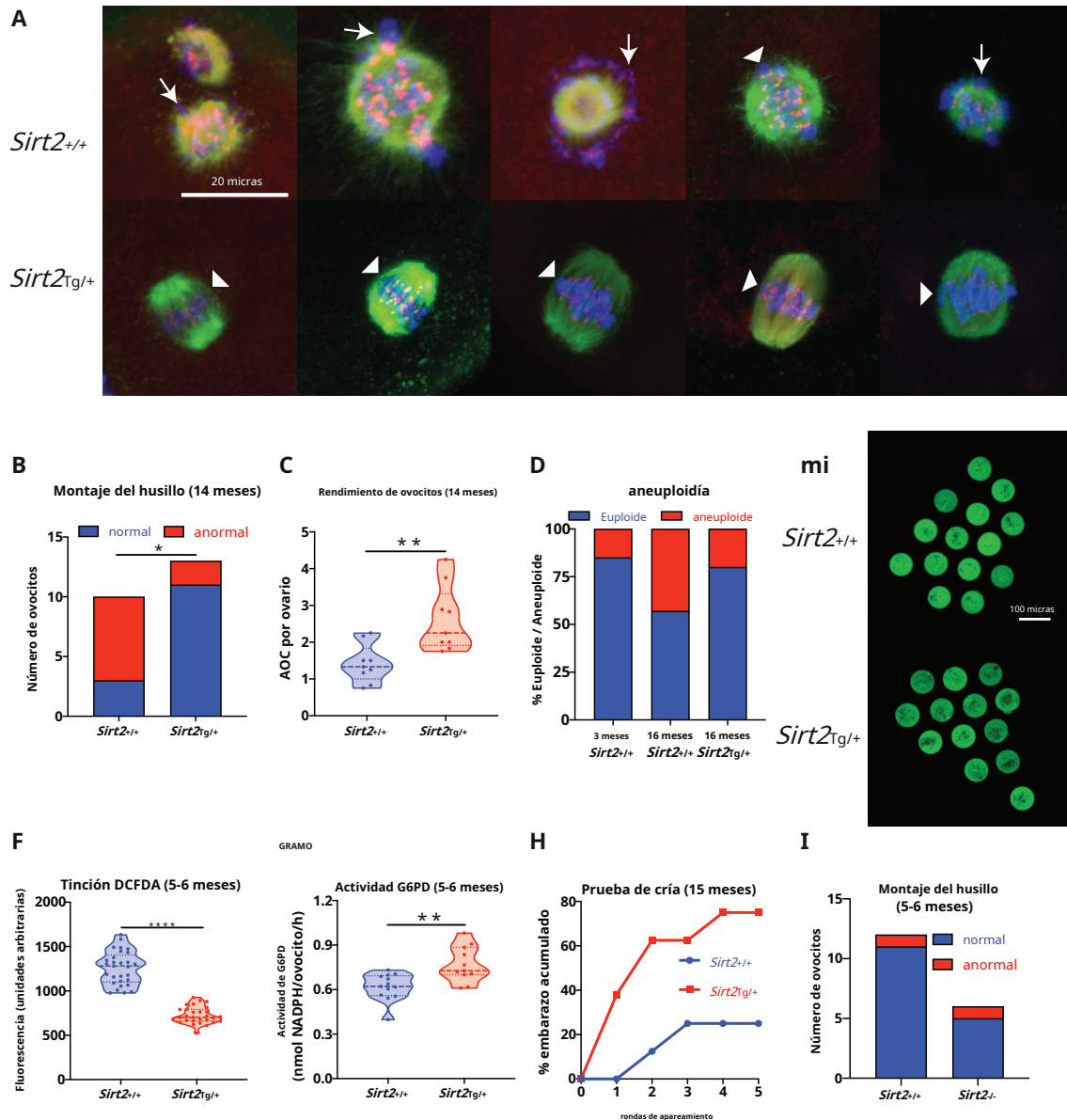


Figura 3. Los ratones transgénicos SIRT2 han mejorado la calidad de los ovocitos

(A y B) Ovocitos de 14 meses *Sirt2*^{tg/+}. Los ratones C57BL/6 se sometieron a (A) inmunotinción para el ensamblaje del huso (B-tubulina en verde, Hoechst para ADN en azul, cinetocoros en rojo). Los husos desordenados con cromosomas rezagados se indican mediante flechas, y los husos bipolares normales en forma de barril con ADN alineado a lo largo de la placa metafásica se indican mediante puntas de flecha; esto se cuantifica en (B) ($p = 0,0131$, $n = 10-13$ ovocitos por grupo, prueba exacta de Fisher).

(C) Rendimiento de ovocitos de edad (14 meses) *Sirt2*^{tg/+} y de tipo salvaje *Sirt2*^{+/+} compañeros de camada (** $p = 0,0030$, prueba t de dos colas, $n = 9$ animales por grupo).

(D) Tasas de aneuploidia en ovocitos de jóvenes (2 meses) y ancianos (16 meses) *Sirt2*^{tg/+} y *Sirt2*^{+/+} compañeros de camada ($n = 26$ jóvenes, $n = 5-7$ años).

(E-G) Ovocitos de *Sirt2*^{tg/+} los ratones habían disminuido los niveles de ROS según lo determinado por (E) H2Tinción DCFDA, cuantificada en (F) (**** $p < 0,0001$, prueba t de dos colas, $n = 29$ ovocitos por grupo), con (G) aumento de la actividad de la enzima G6PD (** $p = 0,0019$, prueba t de dos colas, prueba t, $n = 11-13$ utilizando 5 ovocitos agrupados por muestra de 4 animales por grupo).

(H) Ensayos de apareamiento a partir de los 15 meses de edad para determinar las tasas de embarazo acumuladas ($p = 0,1319$ después de 5 rondas de apareamiento, $n = 8$ animales por grupo, prueba exacta de Fisher).

(I) Montaje del huso en ovocitos de *Sirt2*^{-/-} animales knockout ($n = 6$, 14 ovocitos por grupo).

estos datos sugieren que SIRT2 es suficiente, pero no necesario, para mejorar la calidad de los ovocitos durante el envejecimiento.

A continuación, preguntamos si elevar NAD⁺ también podría beneficiar el desarrollo del embrión antes de la implantación. Para probar esto, la FIV se realizó utilizando *in vivo* ovocitos maduros de edad reproductiva

(12 meses) o hembras jóvenes (4 semanas). Después de la FIV, los embriones se cultivaron en presencia o ausencia de NMN. La suplementación con NMN mejoró la formación de blastocistos en embriones derivados de ovocitos de hembras de edad avanzada (Figura 4A), pero no en embriones derivados de ovocitos de hembras jóvenes (Cifras

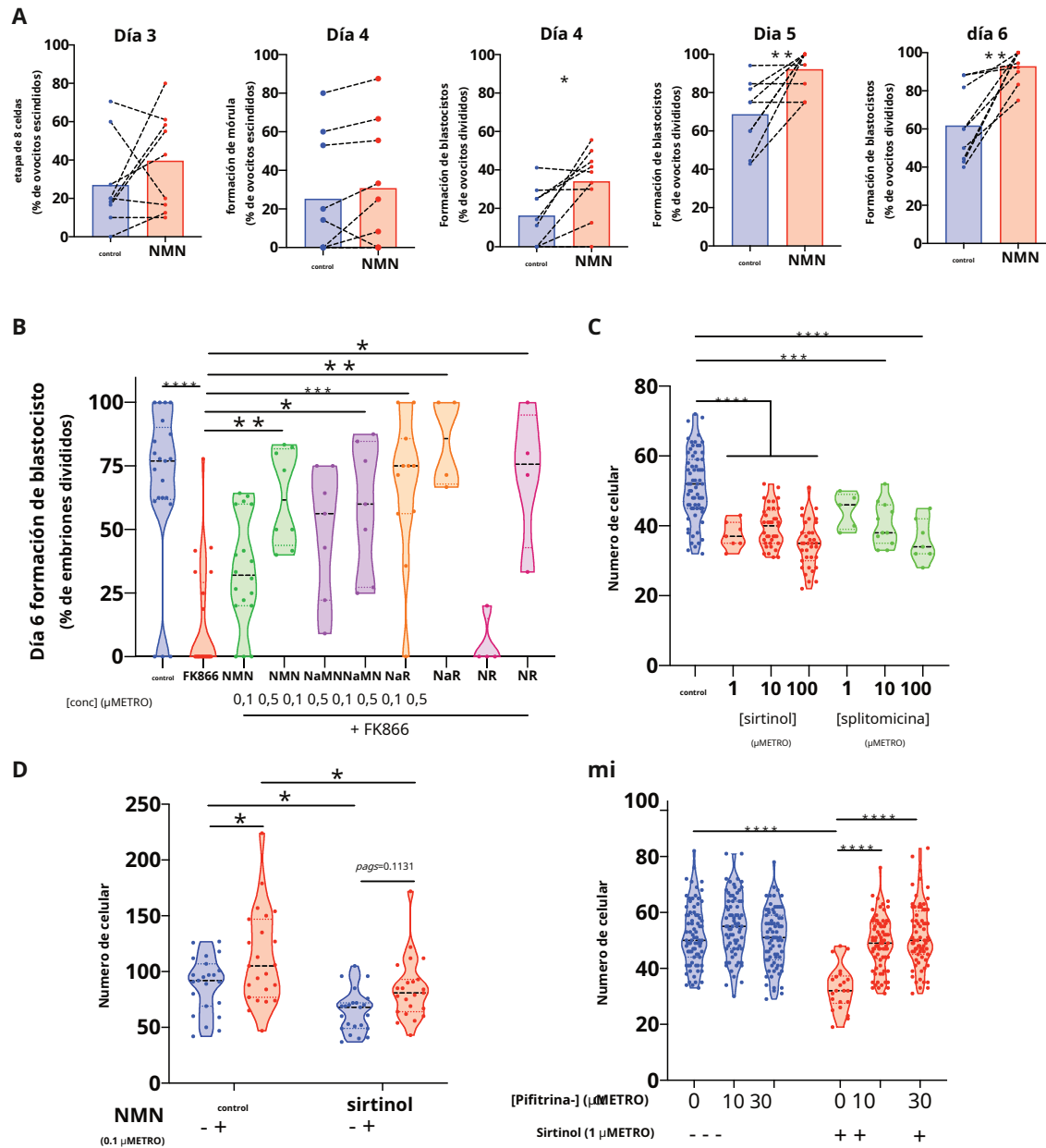


Figura 4. in vitro El tratamiento con NMN mejora la formación de embriones

(A) Los ovocitos de ratones envejecidos (12 meses) se sometieron a FIV y los embriones se mantuvieron en 1 metroM NMN hasta el día 6 de desarrollo embrionario (prueba t de dos colas pareadas, día 4 * $p = 0,0138$, día 5 ** $p = 0,0086$, día 6 ** $p = 0,0014$, $n = 9$ experimentos independientes).

(B) El tratamiento con el inhibidor de NAMPT FK866 causa la muerte del embrión en el día 6, que puede ser rescatado por NAD-precursores NMN, mononucleótido de ácido nicotínico (NaMN), ribósido de ácido nicotínico (NaR) y NR (Kruskal-Wallis 50,65, $p < 0,0001$, **** $p < 0,0001$, ** $p = 0,0048$, * $p = 0,0197$, ** $p = 0,0004$, ** $p = 0,0014$, * $p = 0,0156$, $n = 4-21$ embriones por grupo, como se muestra).

(C) El tratamiento con sirtinol o splitomicina inhibe la formación de blastocistos (suplementario), con disminución del recuento de células en blastocistos (ANOVA unidireccional $F(6,162) = 22,44$, *** $p = 0,0002$, **** $p < 0,0001$ según la prueba de comparación múltiple de Dunnett, $n = 5-67$ por grupo, como se muestra en los puntos de datos sin procesar).

(D) El tratamiento conjunto de embriones tratados con NMN rescata esta reducción (ANOVA $F(1,88)$ de dos vías sirtinol = 17,66, NMN = 12,59, * $p = 0,0360$, 0,0374, **** $p < 0,0001$ por la prueba de comparación múltiple de Sidak, $n = 22-23$ por grupo).

(E) El tratamiento con el inhibidor de p53 pifitrina rescata el recuento de células y la formación de blastocistos (suplementario) en embriones tratados con sirtinol (pifitrina F(2392) = 22,37, sirtinol F(1392) = 49,81, **** $p < 0,0001$ por múltiplo de Sidak prueba de comparación, $n = 72-78$ por grupo).

SSA y SSB). Para evaluar más a fondo si la NMN podría rescatar el desarrollo embrionario en condiciones difíciles, los embriones de animales jóvenes se mantuvieron en un medio de cultivo simple que acentúa el estrés del cultivo y restringe el desarrollo embrionario (Li et al., 2012). De acuerdo con los resultados de animales de edad avanzada, la adición de NMN a medios simples mejoró el número de células de blastocisto, un indicador del éxito de la implantación (Figura S5C).

Las células de mamíferos tienen la capacidad de generar NAD⁺ a través de varias rutas biosintéticas y precursores intermedios (Figura S6; Bieganski y Brenner, 2004; Nishizuka y Hayaishi, 1963; Okuno y Schwarcz, 1985; Preiss y Handler, 1958a, 1958b). Para evaluar si NAD⁺ La síntesis a través de la producción endógena de NMN en la ruta de reciclaje juega un papel en el desarrollo del embrión, cultivamos embriones en presencia del inhibidor de NAMPT FK866 (Hasmann y Schemm, 2003), que indujo la degeneración del blastocisto en el día 6 de cultivo (Figura S5D). Esto podría ser rescatado por cotratamiento NMN (Figura 4B), así como otros NAD⁺ precursores (Figura 4B). Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de la enzima fosforribosiltransferasa del ácido nicotínico (NaPRT) de Priess Handler, ácido 2-hidroxicinotínico (Piacente et al., 2017) no afectó el desarrollo embrionario (Figuras S5E, S5F y S6).

A continuación, buscamos determinar si el tratamiento con NMN generaba beneficios a través de las sirtuinas. Los inhibidores de sirtuina de molécula pequeña sirtinol (Grozinger et al., 2001) y splitomicina (Bedalov et al., 2001) deterioro del crecimiento del embrión en condiciones de medios definidos simples (Li et al., 2012; Figura 4C; Figura S5G), y esta disminución en el número de células embrionarias fue parcialmente revertida por el tratamiento conjunto con NMN (Figura 4D), lo que sugiere que las sirtuinas no son el objetivo principal de la NMN para mejorar el desarrollo del embrión antes de la implantación. Esta interpretación se ve enturbiada por la ausencia de datos que confirmen que el sirtinol ofreció una inhibición completa de sus objetivos, porque solo la inhibición parcial podría dar como resultado que parte del objetivo use un aumento de NAD⁺ para rescatar el desarrollo del embrión.

Dada la capacidad de los inhibidores de sirtuina para reducir la calidad del blastocisto, a continuación buscamos determinar la vía a través de la cual estos inhibidores restringen el crecimiento embrionario. El miembro más destacado de las sirtuinas, SIRT1, desacetila p53 para inhibir su actividad y prevenir la apoptosis (Cheng et al., 2003; Vaziri et al., 2001). La actividad de p53 aumenta en embriones producidos por FIV en comparación con *in vivo* embriones derivados, probablemente debido al estrés del cultivo, y su eliminación genética supera los efectos del cultivo en el desarrollo del blastocisto (Li et al., 2007, 2012). La activación de p53 es perjudicial, porque inhibe la proliferación e induce la apoptosis de la masa celular interna, que pasa a formar el feto en desarrollo (Ganeshan et al., 2010, 2017; Kawamura et al., 2010). Observamos que el tratamiento con el inhibidor de p53 pifitrina (Komarov et al., 1999) superó la reducción del número de células mediada por sirtinol (Figura 4E) y desarrollo de blastocistos (Figura S5H), lo que sugiere que la hipotrofia dependiente de p53 está mediada por sirtuina (Peck et al., 2010).

DISCUSIÓN

Existe una tendencia constante en todo el mundo desarrollado de posponer el embarazo hasta una edad avanzada, lo que lleva a un aumento constante en la demanda de ART. A pesar de que la edad materna es el mayor desafío clínico para la medicina reproductiva, no existen tratamientos

Tratamientos para mejorar la calidad de los ovocitos. En el estudio actual, mostramos que los niveles de NAD(P)H en los ovocitos disminuyen con la edad y demostramos que NAD⁺ la reposición con NMN restaura la calidad de los ovocitos y mejora la tasa de ovulación y la fertilidad. Además, la suplementación de NMN en medios de cultivo de embriones revirtió los efectos adversos de la edad en el desarrollo.

El presente estudio apoya la premisa de que las reducciones relacionadas con la edad en NAD⁺ disponibilidad son un factor determinante de la disminución de la calidad de los ovocitos y la infertilidad femenina y que la restauración farmacológica de NAD⁺ abre una ventana terapéutica para el tratamiento de la infertilidad relacionada con la edad. Quedan varias preguntas, incluida la forma en que el tratamiento con NMN restauraría la calidad de los ovocitos en animales de edad avanzada. Una consecuencia bien conocida de la mala calidad de los ovocitos con el avance de la edad son los defectos de segregación cromosómica, que afectan abrumadoramente a la primera división meiótica (MI). De hecho, entre el 80% y el 90% de las aneuploidías embrionarias relacionadas con la edad son consecuencia de errores de IM femenino (Greaney et al., 2018). La capacidad de segregar cromosomas con precisión depende de múltiples factores que incluyen críticamente el ensamblaje adecuado del huso y la vigilancia de la segregación cromosómica por parte del SAC, que nosotros y otros hemos demostrado que es fundamental para prevenir la aneuploidía en los ovocitos (Homero et al., 2005). La expresión adecuada de factores reguladores clave, incluidas las proteínas SAC, se determina durante una fase de crecimiento prolongada que experimenta el ovocito junto con el desarrollo del folículo dentro del ovario; es durante esta fase de crecimiento que el ovocito es transcripcional y traduccionalmente activo y acumula las reservas requeridas para la maduración del ovocito y las divisiones embrionarias tempranas para cuando tanto la transcripción como la traducción se hayan interrumpido (Greaney et al., 2018). Este es un proceso bioenergéticamente exigente, y el consumo de ATP es máximo en los ovocitos de ratón durante la fase de ensamblaje del huso en MI (Dalton et al., 2014). En ovocitos de ratón, esta fase de crecimiento dura de 2 a 3 semanas antes de la ovulación, mientras que administramos NMN durante 4 semanas. Aunque una explicación de la calidad mejorada de los ovocitos podría estar relacionada con el aumento de la atresia de los ovocitos subóptimos antes de la ovulación debido a la mejora de los mecanismos de control de calidad, planteamos la hipótesis de que la duración del período de tratamiento con NMN mejora la calidad general de los ovocitos durante esta fase crítica de la maduración, sin cambios en la calidad de los ovocitos. clasificación general o mecanismos de control de calidad y, en cambio, disminuye la atresia debido a la mejora de la calidad de los ovocitos. Puede ser que NAD⁺ la deficiencia con la edad impide el metabolismo energético a través de su requerimiento como cofactor redox esencial; por lo tanto, el tratamiento con NMN durante esta fase crítica de susceptibilidad podría reducir las tasas de defectos de ensamblaje del huso y aneuploidía.

Las imágenes hiperespectrales de autofluorescencia de NADH y NADPH revelaron una disminución en los niveles de NAD(P)H del ovocito con la edad, mientras que la espectrometría de masas del ovario entero homogeneizado no reveló una disminución relacionada con la edad en los niveles de NAD(H). Esto puede estar relacionado con el aumento de la edad de los ovocitos, que en la mayoría de los mamíferos se forman durante *in utero* desarrollo y no experimentan recambio en la vida adulta, siendo estas células más antiguas que las células somáticas circundantes. Sería ideal medir los niveles de NAD(H) en ovocitos individuales mediante espectrometría de masas como técnica complementaria, porque nuestra incapacidad para analizar con precisión los metabolitos de NAD mediante espectrometría de masas a nivel unicelular es una limitación de este estudio.

Un aspecto inesperado de este estudio fue que el tratamiento con una dosis más baja de NMN resultó en una mejor fertilidad funcional, como

evaluado por gestación y nacido vivo en animales de edad avanzada. Esto podría sugerir que existe un rango óptimo para la dosificación de NAD⁺ precursores más allá de los cuales otros aspectos de la fertilidad podrían verse afectados adversamente, reduciendo la fertilidad funcional. Esta será una preocupación importante para la traducción clínica de este trabajo, especialmente dado que NAD⁺ precursores como NR están disponibles gratuitamente como suplementos. Por precaución, sugerimos que las mujeres que deseen quedar embarazadas no tomen estos suplementos hasta que se hayan completado más estudios.

El presente estudio implica a la NAD⁺ metaboloma en la regulación de la tasa de ovulación. Nuestra hipótesis es que este cambio en la ovulación resulta de la disminución de la atresia de los folículos durante la maduración, durante la cual los ovocitos exhiben susceptibilidades, como se describió anteriormente, en lugar de cambios en la reserva ovárica. No excluimos la posibilidad de que NMN ejerza beneficios para el desarrollo folicular a través de interacciones directas con tejidos distintos del ovario, porque administramos NMN a través de dosificación sistémica. Además, otros tejidos también pueden ser susceptibles a una disminución de NAD relacionada con la edad.

Aunque NAD⁺ es una molécula prominente utilizada como cofactor o sustrato en una variedad de reacciones, buscamos determinar si los beneficios de NMN para la integridad de los ovocitos podrían estar mediados en parte por el NAD⁺-desacilasa SIRT2 dependiente. Los beneficios *de vivo* El tratamiento con NMN podría recapitularse en gran medida mediante la sobreexpresión transgénica de *Sirt2* en animales viejos, aunque su eliminación constitutiva no tuvo un impacto adverso en la calidad de los ovocitos, al menos en los animales más jóvenes estudiados aquí. SIRT2 desempeña un papel en el mantenimiento de las uniones microtúbulo-cinetocoro a través de su desacetilación y estabilización de BubR1 (Norte et al., 2014; Qiu et al., 2018), un proceso que salvaguarda la fidelidad en la separación cromosómica al asegurar la orientación bipolar de los cromosomas al huso. En consecuencia, en los ovocitos de *Sirt2^{tg/+}* animales que sobreexpresan, los aumentos en la estabilidad del cinetocoro-microtúbulo pueden haber contribuido a la alineación cromosómica aumentada y la fertilidad mejorada. Estas observaciones están de acuerdo con otros *in vitro* estudios en los que química o mediada por morfolino *Sirt2* La caída en los ovocitos resultó en defectos severos del huso y desorganización cromosómica (Qiu et al., 2018; Riepsamen et al., 2015). En contraste con esos estudios, observamos que los ovocitos de constitutivos *Sirt2* Los ratones knockout mantuvieron el ensamblaje del huso y la organización cromosómica normales, lo que sugiere que SIRT2 puede ser prescindible para los ovocitos. Esta interpretación está limitada por la corta edad de los animales knockout en ese experimento; la única forma de determinar definitivamente si SIRT2 media los beneficios de NMN en la fertilidad sería probar el tratamiento con NMN en niños de edad avanzada (de 12 a 14 meses) *Sirt2* ratones knockout. Otra limitación de este estudio fue que no medimos la actividad de ROS o G6PD en los ovocitos de estos animales knockout. Estos datos sugieren la existencia de mecanismos superpuestos que pueden compensar durante el desarrollo. Otros miembros de la familia de las sirtuinas han sido implicados en el desarrollo de ovocitos (Tatone et al., 2018; Zhang et al., 2016), y los estudios adicionales podrían tener como objetivo investigar si estos miembros están involucrados en la mediación de los beneficios del tratamiento NMN observados aquí. En general, nuestros datos aún no sugieren un papel para SIRT2 en la mediación de los beneficios del aumento de NAD. Aumento de NAD⁺ en cambio, los niveles podrían estar afectando a los ovocitos simplemente mejorando el metabolismo energético.

Habiendo demostrado que *en vivo* El tratamiento con NMN en animales de edad avanzada mejoró la calidad de los ovocitos y aumentó la tasa de ovulación y las tasas de natalidad; a continuación, demostramos que la suplementación de los medios de cultivo de embriones con NMN mejoró el desarrollo embrionario en embriones derivados de ovocitos de animales de edad avanzada, pero no de animales jóvenes, lo que respalda la idea de que esta intervención aborda un déficit relacionado con la edad en el NAD del ovocito. Este hallazgo es muy relevante para la práctica clínica de la FIV. Además de los problemas relacionados con la edad de la disminución del número de ovocitos y la calidad de los ovocitos, la aneuploidia mitótica (Munne et al., 2002) y pobre desarrollo embrionario previo a la implantación (Janny y Menezo, 1996) limitan el número de blastocistos euploides disponibles para la transferencia a medida que aumenta la edad materna. La creciente preferencia por las transferencias en estadio de blastocisto en la FIV clínica subraya la importancia de alcanzar hitos de desarrollo más avanzados (Unidad Nacional de Epidemiología y Estadística Perinatal, 2016) y la demanda clínica de intervenciones que puedan mejorar el desarrollo embrionario.

Aunque este estudio usó NMN como NAD⁺ precursor, los precursores alternativos de otras vías también elevan el NAD⁺, más notablemente NR (Trammell et al., 2016). Anticipamos que este y otros compuestos similares también exhibirán eficacia en la calidad y fertilidad de los ovocitos, y es poco probable que estos efectos sean exclusivos de NMN.

Este trabajo representa una intervención farmacológica clínicamente manejable para tratar de forma no invasiva la infertilidad femenina causada por la pérdida de viabilidad de los ovocitos en mujeres en edad reproductiva, con importantes implicaciones clínicas. Prevemos que este trabajo podría conducir al desarrollo de terapias administradas por vía oral que mejoren la calidad de los ovocitos para la concepción natural o la FIV. Además, este trabajo podría mejorar las tasas de éxito de los protocolos de FIV existentes al mejorar las condiciones de cultivo de embriones y los resultados del desarrollo. Cualquier intervención que mejore la fertilidad conduciría a un ahorro de costos y reduciría el estrés emocional de las rondas de FIV fallidas o la infertilidad que puede provocar problemas psicológicos y sociales a largo plazo, incluida la depresión y la ruptura de la relación. Esto podría representar una intervención que permita a las mujeres con mala calidad de ovocitos tener hijos con su propia composición genética, porque actualmente, estas mujeres no tienen otra alternativa que usar ovocitos donados. Los estudios futuros deben apuntar a probar NAD⁺-crear compuestos en un entorno clínico, tanto como un agente terapéutico oral como un aditivo para los medios embrionarios, para evaluar la relevancia de estos hallazgos para la infertilidad humana. Si bien es prometedor, advertimos contra el uso de NAD⁺ aumentar los suplementos hasta que se hayan completado estos estudios clínicos.

ESTRELLA+MÉTODOS

Los métodos detallados se proporcionan en la versión en línea de este documento e incluyen lo siguiente:

- ▷ TABLA DE RECURSOS CLAVE
- ▷ CONTACTO CON EL PLOMO Y DISPONIBILIDAD DE MATERIALES
- ▷ MODELO EXPERIMENTAL Y DETALLES DEL SUJETO
- ▷ DETALLES DEL MÉTODO

- ▷ Estimulación ovárica, recolección de ovocitos para *in vitro* maduro-evaluación de raciones y husos (Figuras 1 y 2)
- ▷ Tratamiento con Monastrol y evaluación de la ploidía
- ▷ Recolección de ovocitos e imágenes confocales – DCFDA tinción

B FIV y cultivo de embriones

B actividad de G6PD

B NAD⁺ mediciones

B Imágenes hiperespectrales

D CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

D DISPONIBILIDAD DE DATOS Y CÓDIGOS

D RECURSOS ADICIONALES

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

La información complementaria se puede encontrar en línea en <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.058>.

EXPRESIONES DE GRATITUD

Financiado por el National Health and Medical Research Council (NHMRC) de Australia (APP1103689, APP1122484, APP1139763, APP1044295, APP1066172 y APP1127821) y el Australian Research Council (ARC) (DP170101863 y CE140100003). El salario y los costos experimentales de MJB y DMG que trabajan en el laboratorio de RBG y LEW fueron financiados en parte por contratos de investigación patrocinados por Jumpstart Fertility a UNSW. KS era un empleado de Jumpstart Fertility. Agradecemos la asistencia del Centro de Recursos Biológicos de la UNSW. El resumen gráfico de este artículo se creó con BioRender. Deseamos agradecer a los donantes anónimos por su apoyo filantrópico.

CONTRIBUCIONES DE AUTOR

LEW, HAH y DAS concibieron este estudio y obtuvieron financiación. LEW, HAH, DAS, RBG, KAW, CO, MJM y EG diseñaron y supervisaron experimentos y analizaron e interpretaron los resultados. W.-HJH, DRL, MJB, DMG, AHR, KS, W.-GNL, ASAW, DR, CL, JM, NAY, LL, RMW, L.-JK, SB, XJL, SM, JMC, AH y MBM realizaron experimentos y analizaron los resultados. AT generó *Nmnat3* ratones transgénicos. ASM asistió en el análisis estadístico. NT y DGLC proporcionaron comentarios críticos. LEW escribió y preparó este manuscrito.

DECLARACIÓN DE INTERESES

LEW, HAH y DAS son cofundadores, accionistas, directores y asesores de Jumpstart Fertility Inc., que se fundó para desarrollar el trabajo descrito aquí, y son inventores de una patente (WO2019023748A1 "Métodos para mejorar la fertilidad") que forma la base de este trabajo y ha obtenido la licencia de Jumpstart Fertility. DAS es inventor de una patente (WO2013002880A1) que anteriormente fue licenciada a Jumpstart Fertility. Los salarios de MJB y DMG que trabajan en los laboratorios de LEW y RBG en UNSW fueron pagados por una investigación patrocinada por Jumpstart Fertility a UNSW. KS era un empleado de Jumpstart Fertility. W.-HJH y DRL tienen acciones en Jumpstart Fertility. HAH emprende ART en el sector privado en afiliación con Queensland Fertility Group. LEW y DAS también son asesores y accionistas de Eden-Roc Sciences (Metro Biotech NSW, Metro Biotech, Liberty Biosecurity) y de Life Biosciences LLC y sus filiales (Jumpstart Fertility, Continuum Biosciences, Senolytic Therapeutics, Selphagy, Animal Biosciences, Iduna). LEW proporciona trabajo de consultoría para Life Biosciences y es asesor y accionista de Intravital Pty Ltd. DAS también es fundador, accionista, asesor, director, consultor, inversor y/o inventor de patentes con licencia para Vium, Jupiter Orphan Therapeutics, Cohbar, Galilei Biosciences, Wellomics, EdenRoc Sciences (y sus filiales Arc-Bio, Dovetail Genomics, Claret, Revere Biosciences, UpRNA, MetroBiotech, Liberty Biosecurity), Life Biosciences (y sus filiales Selphagy, Senolytic Therapeutics, Spotlight Therapeutics, Animal Biosciences, Iduna, Continuum, Jumpstart Fertility, Iduna). DAS es un inventor en una solicitud de patente presentada por Mayo Clinic y la Escuela de Medicina de Harvard que ha sido autorizada a Elysium Health. Para más detalles ver <https://genetics.med.harvard.edu/sinclair>.

Recibido: 12 de septiembre de 2019

Revisado: 3 de noviembre de 2019

Aceptado: 17 de enero de 2020

Publicado: 11 de febrero de 2020

REFERENCIAS

- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, BJ, Shaman, A. y Gupta, S. (2012). Los efectos del estrés oxidativo en la reproducción femenina: una revisión. *reprod. Biol. Endocrinol.* **10**, 49.
- Atzmon, Y., Shoshan-Karchovsky, E., Michaeli, M., Aslih, N., Shrem, G., Ellenbogen, A. y Shalom-Paz, E. (2017). La obesidad se produce con un ovocito más pequeño en *in vitro* ciclos de fecundación/inyección intracitoplasmática de espermatozoides: un estudio prospectivo. *J. Ayudar. reprod. Gineta.* **34**, 1145–1151.
- Bedalov, A., Gatabont, T., Irvine, WP, Gottschling, DE y Simon, JA (2001). Identificación de una pequeña molécula inhibidora de Sir2p. *proc. nacional Academia ciencia EE.UU.* **98**, 15113–15118.
- Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M. y Ziegler, M. (2005). Compartimentación subcelular y propiedades catalíticas diferenciales de las tres isoformas de adeniltransferasa del mononucleótido de nicotinamida humana. *J. Biol. química* **280**, 36334–36341.
- Bieganowski, P. y Brenner, C. (2004). Los descubrimientos del ribósido de nicotinamida como nutriente y los genes NRK conservados establecen una ruta independiente de Preiss-Handler hacia NAD⁺ en hongos y humanos. *Celda* **117**, 495–502.
- Bitterman, KJ, Anderson, RM, Cohen, HY, Latorre-Esteves, M. y Sinclair, DA (2002). Inhibición del silenciamiento y envejecimiento acelerado por nicotinamida, un supuesto regulador negativo de sir2 de levadura y SIRT1 humana. *J. Biol. química* **277**, 45099–45107.
- Bustamante, S., Jayasena, T., Richani, D., Gilchrist, RB, Wu, LE, Sinclair, DA, Sachdev, PS y Braid, N. (2017). Cuantificación del metaboloma celular NAD⁺ utilizando un enfoque de espectrometría de masas de cromatografía líquida en tándem. *metabolómica* **14**, 15.
- Cheng, HL, Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, JP, Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, FW y Chua, KF (2003). Defectos de desarrollo e hiperacetilación de p53 en ratones deficientes en homólogo de Sir2 (SIRT1). *proc. nacional Academia ciencia EE.UU.* **100**, 10794–10799.
- Dalton, CM, Szabadkai, G. y Carroll, J. (2014). Medición de ATP en ovocitos individuales: impacto de la maduración y las células del cúmulo en los niveles y el consumo. *J. celular. Fisiol.* **229**, 353–361.
- De Vos, M., Smits, J. y Woodruff, TK (2014). Preservación de la fertilidad en mujeres con cáncer. *Lanceta* **384**, 1302–1310.
- Dong, Y., Digman, MA y Brewer, GJ (2019). Estado redox relacionado con la edad y la EA de NADH en compartimentos subcelulares mediante microscopía de imágenes de fluorescencia de por vida. *Gerociencia* **41**, 51–67.
- Ear, PH, Chadda, A., Gumusoglu, SB, Schmidt, MS, Vogeler, S., Malicoat, J., Kadel, J., Moore, MM, Migaud, ME, Stevens, HE, et al. (2019). El ribósido de nicotinamida materna mejora la pérdida de peso posparto, el desarrollo de la descendencia juvenil y la neurogénesis de la descendencia adulta. *representante celular* **26**, 969–983.
- Franasiak, JM, Forman, EJ, Hong, KH, Werner, MD, Upham, KM, Treff, NR y Scott, RT, Jr. (2014). La naturaleza de la aneuploidia con el aumento de la edad de la pareja femenina: una revisión de 15.169 biopsias de trofoectodermo consecutivas evaluadas con un cribado cromosómico completo. *fértil. estéril.* **101**, 656–663.
- Ganeshan, L., Li, A. y O'Neill, C. (2010). La expresión de la proteína 53 relacionada con la transformación en el embrión de ratón temprano compromete el desarrollo embrionario previo a la implantación al evitar la formación de una masa celular interna proliferante. *Biol. reprod.* **83**, 958–964.
- Ganeshan, L., Jin, XL y O'Neill, C. (2017). La inducción de la proteína supresora de tumores P53 limita la entrada de células en el linaje pluripotente de la masa celular interna en el embrión de ratón. *Exp. Resolución celular* **358**, 227–233.
- Gosnell, ME, Anwer, AG, Cassano, JC, Sue, CM y Goldys, EM (2016a). Las imágenes hiperespectrales funcionales capturan detalles sutiles del metabolismo celular en las células de la neuroesfera olfativa, modelos específicos de enfermedades de los trastornos neurodegenerativos. *bioquímica Biografía. acta* **1863**, 56–63.

- Gosnell, ME, Anwer, AG, Mahbub, SB, Perinchery, SM, Inglis, DW, Adhikary, PP, Jazayeri, JA, Cahill, MA, Saad, S. y Pollock, CA (2016b). Caracterización celular cuantitativa no invasiva y discriminación basada en características de autofluorescencia multispectral. *ciencia Reps.* **6**, 23453.
- Greaney, J., Wei, Z. y Homer, H. (2018). Regulación de la segregación cromosómica en ovocitos y la base celular de los errores meióticos femeninos. *Tararear. reprod. Actualizar* **24**, 135–161.
- Grozier, CM, Chao, ED, Blackwell, HE, Moazed, D. y Schreiber, SL (2001). Identificación de una clase de inhibidores de molécula pequeña de la familia de sirtuinas de desacetilasas dependientes de NAD mediante cribado fenotípico. *J. Biol. química* **276**, 38837–38843.
- Habibalahi, A., Bala, C., Allende, A., Anwer, AG y Goldys, EM (2019). Nueva detección automatizada no invasiva de neoplasia escamosa de la superficie ocular utilizando imágenes de autofluorescencia multispectral. *Ocul. Navegar* **17**, 540–550.
- Hasmann, M. y Schemainda, I. (2003). FK866, un inhibidor no competitivo altamente específico de la nicotinamida fosforribosiltransferasa, representa un mecanismo novedoso para la inducción de la apoptosis de las células tumorales. *Cáncer Res.* **63**, 7436–7442.
- Homero, H. (2013). El APC/C en la meiosis de mamíferos femeninos I. *Reproducción* **146**, R61–R71.
- Homer, HA, McDougall, A., Levasseur, M., Yallop, K., Murdoch, AP y Herbert, M. (2005). Mad2 previene la aneuploidía y la proteólisis prematura de ciclina B y securina durante la meiosis I en ovocitos de ratón. *Genes Dev.* **19**, 202–207.
- Homer, H., Gui, L. y Carroll, J. (2009). Una proteína de punto de control del ensamblaje del huso funciona en la detención de la profase I y la progresión de la prometáfase. *Ciencias* **326**, 991–994.
- Janny, L. y Menezo, YJ (1996). Efecto de la edad materna en el desarrollo embrionario humano temprano y la formación de blastocistos. *mol. reprod. desarrollo* **45**, 31–37.
- Jemilo, B., Harvey, S. y Novotny, M. (1986). Promoción del efecto Whitten en ratones hembra por análogos sintéticos de constituyentes urinarios masculinos. *proc. nacional Academia ciencia EE.UU* **83**, 4576–4579.
- Jin, F., Hamada, M., Malureanu, L., Jeganathan, KB, Zhou, W., Morbeck, DE y van Deursen, JM (2010). Cdc20 es fundamental para la meiosis I y la fertilidad de ratones hembra. *PLoS Genet.* **6**, e1001147.
- Kapoor, TM, Mayer, TU, Coughlin, ML y Mitchison, TJ (2000). Sondeo de los mecanismos de ensamblaje del huso con monastrol, una molécula pequeña inhibidora de la kinesina mitótica, Eg5. *J. Cell Biol.* **150**, 975–988.
- Kawamura, Y., Uchijima, Y., Horike, N., Tonami, K., Nishiyama, K., Amano, T., Asano, T., Kurihara, Y. y Kurihara, H. (2010). Sirt3 protege *in vitro* embriones de preimplantación de ratón fertilizados contra la detención del desarrollo mediada por p53 inducida por estrés oxidativo. *J. Clin. Invertir.* **120**, 2817–2828.
- Keshava, N. (2003). Una encuesta de algoritmos de desmezcla espectral. *Linc. Laboratorio.* **14**, 55–78.
- Keshava, N. y Mustard, JF (2002). Desmezcla espectral. *Proceso de señal IEEE. revista* **19**, 44–57.
- Keshava, N., Kerekes, JP, Manolakis, DG y Shaw, GA (2000). Taxonomía de algoritmos para desmezcla hiperespectral. *Actas de los algoritmos para imágenes multispectrales, hiperespectrales y ultraespectrales VI* **4049**, 42–63.
- Kim, HS, Vassilopoulos, A., Wang, RH, Lahusen, T., Xiao, Z., Xu, X., Li, C., Veenstra, TD, Li, B., Yu, H., et al. (2011). SIRT2 mantiene la integridad del genoma y suprime la tumorigénesis mediante la regulación de la actividad de APC/C. *Célula cancerosa* **20**, 487–499.
- Kolenc, OI y Quinn, KP (2019). Evaluación del metabolismo celular mediante imágenes de autofluorescencia de NAD(P)H y FAD. *antioxidante Señal redox.* **30**, 875–889.
- Komarov, PG, Komarova, EA, Kondratov, RV, Christov-Tselkov, K., Coon, JS, Chernov, MV y Gudkov, AV (1999). Un inhibidor químico de p53 que protege a los ratones de los efectos secundarios de la terapia contra el cáncer. *Ciencias* **285**, 1733–1737.
- Kumar, P., Sait, SF, Sharma, A. y Kumar, M. (2011). Síndrome de hiperestimulación ovárica. *J. Hum. reprod. ciencia* **4**, 70–75.
- Lane, M. y Gardner, DK (1997). Regulación diferencial del desarrollo y viabilidad de embriones de ratón por medio de aminoácidos. *J. Reprod. fértil.* **109**, 153–164.
- Li, A., Chandrakanthan, V., Chami, O. y O'Neill, C. (2007). El cultivo de cigotos aumenta la expresión de TRP53 [corregida] en embriones de ratón B6, lo que reduce la viabilidad del embrión. *Biol. reprod.* **76**, 362–367.
- Li, A., Ganeshan, L. y O'Neill, C. (2012). El efecto de la dosificación del gen Trp53 y el padre de origen de la herencia en la función de gametos y embriones de ratón *in vitro*. *Biol. reprod.* **86**, 175.
- Li, HJ, Sutton-McDowall, ML, Wang, X., Sugimura, S., Thompson, JG y Gilchrist, RB (2016). Extender la prematuridad con moduladores de AMPc mejora la contribución del cúmulo a la defensa antioxidante de los ovocitos y la calidad de los ovocitos a través de uniones gap. *Tararear. reprod.* **31**, 810–821.
- Mahbub, SB, Plöschner, M., Gosnell, ME, Anwer, AG y Goldys, EM (2017). Identificación cuantitativa estadísticamente fuerte sin etiquetas de fluoróforos nativos en una muestra biológica. *ciencia Reps.* **7**, 15792.
- Maniam, J. y Morris, MJ (2010). La dieta apetecible de la cafetería mejora la ansiedad y los síntomas similares a la depresión después de un entorno temprano adverso. *Psiconeuroendocrinología* **35**, 717–728.
- Marquard, KL, Stephens, SM, Jungheim, ES, Ratts, VS, Odem, RR, Lanzendorf, S. y Moley, KH (2011). El síndrome de ovario poliquístico y la obesidad materna afectan el tamaño de los ovocitos en los ciclos de fecundación *in vitro*/inyección intracitoplasmática de espermatozoides. *fértil. estéril.* **95**, 2146–2149.
- Massudi, H., Grant, R., Braid, N., Guest, J., Farnsworth, B. y Guillemain, GJ (2012). Cambios asociados con la edad en el estrés oxidativo y el metabolismo de NAD⁺ en tejido humano. *Más uno* **7**, e42357.
- Mills, KF, Yoshida, S., Stein, LR, Grozio, A., Kubota, S., Sasaki, Y., Redpath, P., Migaud, ME, Apte, RS, Uchida, K., et al. (2016). La administración a largo plazo de mononucleótido de nicotinamida mitiga el deterioro fisiológico asociado con la edad en ratones. *Metab. celular* **24**, 795–806.
- Munné, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Márquez, C. y Cohen, J. (2002). Mosaicismo cromosómico en embriones humanos en etapa de escisión: evidencia de un efecto de la edad materna. *reprod. biomedicina En línea* **4**, 223–232.
- Nishizuka, Y. y Hayaishi, O. (1963). Estudios sobre la Biosíntesis de Nicotinamida Adenina Dinucleótido. I. Síntesis enzimática de ribonucleótidos de niacina a partir de ácido 3-hidroxiantranílico en tejidos de mamíferos. *J. Biol. química* **238**, 3369–3377.
- North, BJ, Rosenberg, MA, Jeganathan, KB, Hafner, AV, Michan, S., Dai, J., Baker, DJ, Cen, Y., Wu, LE, Sauve, AA, et al. (2014). SIRT2 induce el punto de control quinasa BubR1 para aumentar la vida útil. *EMBÓ J.* **33**, 1438–1453.
- Unidad Nacional de Epidemiología y Estadística Perinatal (2016). Tecnología de reproducción asistida en Australia y Nueva Zelanda 2016 (UNSW Sydney).
- O'Neill, C. (1997). Evidencia del requisito de factores de crecimiento autocrinos para el desarrollo de embriones preimplantacionales de ratón *in vitro*. *Biol. reprod.* **56**, 229–237.
- Okuno, E. y Schwarcz, R. (1985). Purificación de ácido quinolínico fosforribosiltransferasa de hígado y cerebro de rata. *bioquímica Biografía. acta* **841**, 112–119.
- Peck, B., Chen, CY, Ho, KK, Di Fruscia, P., Myatt, SS, Coombes, RC, Fuchter, MJ, Hsiao, CD y Lam, EW (2010). Los inhibidores de SIRT inducen la muerte celular y la acetilación de p53 al dirigirse tanto a SIRT1 como a SIRT2. *mol. Cáncer Ther.* **9**, 844–855.
- Piacente, F., Caffa, I., Ravera, S., Sociali, G., Passalacqua, M., Vellone, VG, Becherini, P., Reverberi, D., Monacelli, F., Ballestrero, A., et al. (2017). La fosforribosiltransferasa del ácido nicotínico regula el metabolismo de las células cancerosas, la susceptibilidad a los inhibidores de NAMPT y la reparación del ADN. *Cáncer Res.* **77**, 3857–3869.
- Preiss, J. y Handler, P. (1958a). Biosíntesis del nucleótido de difosfopiridina. I. Identificación de intermediarios. *J. Biol. química* **233**, 488–492.
- Preiss, J. y Handler, P. (1958b). Biosíntesis del nucleótido de difosfopiridina. II. Aspectos enzimáticos. *J. Biol. química* **233**, 493–500.
- Qiu, D., Hou, X., Han, L., Li, X., Ge, J. y Wang, Q. (2018). La vía de acetilación de Sirt2-BubR1 media los efectos de la edad materna avanzada en la calidad de los ovocitos. *Célula de envejecimiento* **17**, e12698.

- Rajman, L., Chwalek, K. y Sinclair, DA (2018). Potencial terapéutico de las moléculas potenciadoras de NAD: *el En vivo* Evidencia. *Metab. celular* 27, 529–547.
- Rehman, AU, Anwer, AG, Gosnell, ME, Mahbub, SB, Liu, G. y Goldys, EM (2017). Apagado de fluorescencia de NADH libre y unido en células HeLa determinado por imágenes hiperespectrales y desmezcla de autofluorescencia celular. *biomedicina Optar. Rápido* 8, 1488–1498.
- Riepsamen, A., Wu, L., Lau, L., Listijono, D., Ledger, W., Sinclair, D. y Homer, H. (2015). La nicotinamida impide la entrada y salida de la meiosis I en los ovocitos de ratón. *Más uno* 10, e0126194.
- Riris, S., Webster, P. y Homer, H. (2014). Análisis digital de mRNA multiplexado de genes funcionalmente importantes en ovocitos humanos individuales y correlación de cambios en los niveles de transcripción con la expresión de proteínas de ovocitos. *fértil. estéril.* 101, 857–864.
- Sauer, MV (2015). Reproducción a edad materna avanzada y salud materna. *fértil. estéril.* 103, 1136–1143.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: una plataforma de código abierto para el análisis de imágenes biológicas. *Nat. Métodos* 9, 676–682.
- Tatone, C., Di Emidio, G., Barbonetti, A., Carta, G., Luciano, AM, Falone, S. y Amicarelli, F. (2018). Sirtuins en biología de gametos y fisiología reproductiva: funciones emergentes y potencial terapéutico en la infertilidad femenina y masculina. *Tararear. reprod. Actualizar* 24, 267–289.
- Tian, WN, Braunstein, LD, Pang, J., Stuhlmeier, KM, Xi, QC, Tian, X. y Stanton, RC (1998). Importancia de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para el crecimiento celular. *J. Biol. química* 273, 10609–10617.
- Touati, SA, Buffin, E., Cladière, D., Hached, K., Rachez, C., van Deursen, JM y Wassmann, K. (2015). Los ovocitos de ratón dependen de BubR1 para la segregación cromosómica adecuada, pero no para la detención de la profase I. *Nat. común* 6, 6946.
- Trammell, SA, Schmidt, MS, Weidemann, BJ, Redpath, P., Jaksch, F., Dellinger, RW, Li, Z., Abel, ED, Migaud, ME y Brenner, C. (2016). El ribósido de nicotinamida tiene una biodisponibilidad única y oral en ratones y humanos. *Nat. común* 7, 12948.
- Vaziri, H., Dessain, SK, Ng Eaton, E., Imai, SI, Frye, RA, Pandita, TK, Guarente, L. y Weinberg, RA (2001). hSIR2(SIRT1) funciona como una desacetilasa p53 dependiente de NAD. *Celda* 107, 149–159.
- Vidal, M. y Amigo, JM (2012). Preprocesado de imágenes hiperespectrales. Pasos esenciales antes del análisis de imágenes. *quimiometro Intel. Laboratorio. sist.* 117, 138–148.
- Wang, YP, Zhou, LS, Zhao, YZ, Wang, SW, Chen, LL, Liu, LX, Ling, ZQ, Hu, FJ, Sun, YP, Zhang, JY, et al. (2014). La regulación de la acetilación de G6PD por SIRT2 y KAT9 modula la homeostasis de NADPH y la supervivencia celular durante el estrés oxidativo. *EMBÓ J.* 33, 1304–1320.
- Wu, LE, Meoli, CC, Mangiafico, SP, Fazakerley, DJ, Cogger, VC, Mohamad, M., Pant, H., Kang, MJ, Powter, E., Burchfield, JG, et al. (2014). La neutralización sistémica de VEGF-A mejora la disfunción metabólica inducida por la dieta. *Diabetes* 63, 2656–2667.
- Yahata, N., Yuasa, S. y Araki, T. (2009). La expresión del mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa en la matriz mitocondrial retrasa la degeneración walleriana. *J. Neurosci.* 29, 6276–6284.
- Yeo, CX, Gilchrist, RB, Thompson, JG y Lane, M. (2008). El factor 9 de diferenciación del crecimiento exógeno en los medios de maduración de ovocitos mejora el desarrollo embrionario posterior y la viabilidad fetal en ratones. *Tararear. reprod.* 23, 67–73.
- Yoshino, J., Mills, KF, Yoon, MJ e Imai, S. (2011). El mononucleótido de nicotinamida, un intermediario clave de NAD(+), trata la fisiopatología de la diabetes inducida por la dieta y la edad en ratones. *Metab. celular* 14, 528–536.
- Zhang, L., Hou, X., Ma, R., Moley, K., Schedl, T. y Wang, Q. (2014). Sirt2 funciona en la organización del huso y la alineación cromosómica en la meiosis de ovocitos de ratón. *FASEB J.* 28, 1435–1445.
- Zhang, J., Fang, L., Lu, Z., Xiong, J., Wu, M., Shi, L., Luo, A. y Wang, S. (2016). ¿Son las sirtuinas marcadores del envejecimiento ovárico? *Gene* 575, 680–686.
- Zhu, CT y Rand, DM (2012). Un ensayo de ciclos acoplados con hidracina valida la disminución de la relación redox en condiciones de inanición en *Drosófila*. *Más uno* 7, e47584.

ESTRELLA+MÉTODOS

TABLA DE RECURSOS CLAVE

Siempre que fue posible, enumeramos los recursos utilizando números RRID de la base de datos de SciCrunch.

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
anticuerpos		
Antihumano de cabra con etiqueta Alexa Fluor 546	Invitrogen	RRID:AB_2535745
Anti-ratón de cabra con etiqueta Alexa Fluor 488	Invitrogen	RRID:AB_2534069
Anticuerpos humanos anticentrómero (ACA)	immunovision	RRID:AB_2744669
ratón anti-B-tubulina	Sigma	RRID:AB_2827403
SIRT2	Sigma	RRID:AB_1079981
SIRT1	Tecnologías de señalización celular	RRID:AB_2617130
actina	Millipore	RRID:AB_2223041
IgG anti-conejo de cabra conjugada con HRP	Bio-Rad	RRID:AB_11125143
IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP	Bio-Rad	RRID:AB_11125547
NMNAT1	Santa Cruz	RRID:AB_2153131
NMNAT3	Santa Cruz	RRID:AB_2819344
Sustancias químicas, péptidos y proteínas recombinantes		
Hoescht 33342 (bis-benzimida 33342)	Sigma-Aldrich, Australia	99403
Sistema de detección de quimioluminiscencia ECL Prime	Salud de GE	RPN2232
Mononucleótido de nicotinamida	Biotechnologías GeneHarbor, Hong Kong	n / A
Gonadotropina sérica de yegua preñada (Folligon)	MSD Animal Health, Australia Intervet, Boxmeer, Holanda	
Tritón X-100	Sigma-Aldrich, Australia	T8787
3-isobutil-1-metilxantina	Sigma-Aldrich, Australia	I7018
Parafina	EMD Millipore, Australia	ES-005-C
Medios M2	Sigma Aldrich, Australia	M7167
Albúmina de suero bovino	Sigma Aldrich, Australia	
monastrol	Sigma	M8515
Tinción de ácido nucleico Sytox Green	Invitrogen	S7020
tamponado con HEPES a-medio esencial mínimo	GIBCO Life Technologies, Grand Island, Nueva York	
gonadotropina coriónica humana	Chorulón, MSD Salud Animal, Australia	
5-(y-6)-clorometil-2,4-diacetato de ,7'-diclorodihidrofluoresceína (CM-H2DCFDA)	Invitrogen	C6827
Medios de lavado (Lavado de investigación)	Soluciones veterinarias de FIV (Adelaida, Australia)	
Medios de escisión (Research Cleave)	Soluciones veterinarias de FIV (Adelaida, Australia)	
Modelos Experimentales: Organismos/Cepas		
Ratones C57BL6/JAusb	Recursos biológicos australianos, Moss Vale	RRID:MGI:6200612
Ratones SwissTacAusb	Recursos biológicos australianos, Moss Vale	
Ratones transgénicos SIRT2 B6.Cg- <i>Col1a1^{tm1(CAG-Sirt2)}mil</i> Dsinj), cepa #029604	laboratorio jackson	RRID:IMSR_JAX:029604
ratones knockout para SIRT2 (B6.129- <i>Sirt2^{tm1.1Fwal}</i>), cepa #012772	laboratorio jackson	RRID:IMSR_JAX:012772
Ratones transgénicos NMNAT1	Obtenido bajo acuerdo de transferencia de material de NCPP, Japón.	RRID:IMSR_RBRC03166
Ratones transgénicos NMNAT3	Obtenido bajo acuerdo de transferencia de material de NCPP, Japón.	RRID:IMSR_RBRC03167
Software y Algoritmos		
Software de adquisición y análisis NIS-Elements C	Nikon, Japón	
Software ImageJ Fiji		RRID:SCR_002285

(Continúa en la siguiente página)

Continuado

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
Software Xcalibur versión 2.2, 2011	ThermoFisher Scientific, Waltham MA	RRID:SCR_014593
G*Potencia 3.1	Heinrich Heine Universität Düsseldorf	RRID:SCR_013726
Prisma v8.1.2	GraphPad	RRID:SCR_002798
Otro		
Microscopio confocal multifotónico A1 MP+	Nikon, Japón	
plato confocal de 35 mm con fondo de vidrio	Corporación MatTek.	
Espectrómetro de masas TSQAccess	ThermoFisher Scientific, Waltham MA	
Cámara de microscopía Prime 95B CMOS (imágenes multiespectrales)	Fotometría	
Fluorímetro FluoroMax Plus-C (imágenes multiespectrales calibración del microscopio)	Horiba	
Dieta Chow (alimento para ratones)	Fuentes de alimentación especializadas de Gordon's, Yanderra, Nueva Gales del Sur, Australia	
Accu-check (medidor de glucosa de mano)	Roche	
EchoMRI (IRM cuantitativa, composición corporal)	EcoMRI, Houston TX, EE. UU.	
Ultrasonido VisualSonics Vevo 2100	VisualSonics	RRID:SCR_015816

CONTACTO CON EL PLOMO Y DISPONIBILIDAD DE MATERIALES

La información adicional y las solicitudes de recursos y reactivos deben dirigirse y serán cumplidas por el contacto principal, Lindsay Wu (lindsay.wu@unsw.edu.au). Este estudio no generó ningún reactivo único nuevo. Obtuvimos líneas de ratones transgénicos NMNAT1 y NMNAT3 del laboratorio de Toshiyuki Araki bajo un MTA de NCCP Japón, y compartiremos estas cepas en espera del permiso de NCCP Japón para cada solicitud.

MODELO EXPERIMENTAL Y DETALLES DEL SUJETO

Ratón transgénico y de tipo salvaje (*Mus musculus*) se criaron en Australian Bio-Resources (ABR) en Moss Vale, NSW Australia y se entregaron a UNSW Sydney a las 6-7 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas individualmente a 22-C al 80% de humedad a una densidad de hasta 5 por jaula, con *ad libitum* acceso a alimentos y agua. Toda el agua en esta casa de animales se acidificó a pH 3 con HCl para disminuir el crecimiento microbiano. La casa de animales de UNSW mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con luces encendidas a las 07:00 y apagadas a las 19:00. Con la excepción de los ratones SwissTacAusb utilizados en [Figura 2C](#), los animales estaban en el fondo C57BL/6JAusb. Las edades de los animales en cada experimento se pueden encontrar en las leyendas de las figuras. Los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación previa del Comité de Ética y Cuidado Animal (ACEC) de UNSW con los números ACEC 13/134B, 15/134A y 18/133A. UNSW ACEC opera bajo las pautas de ética animal del Consejo Nacional de Investigación Médica y de Salud (NHMRC) de Australia. La generación de las cepas de ratones transgénicos SIRT2, NMNAT1 y NMNAT3 utilizadas aquí fue como se describió anteriormente ([Norte et al., 2014](#); [Yahata et al., 2009](#)).

DETALLES DEL MÉTODO

Estimulación ovárica, recolección de ovocitos para in vitro maduración y evaluación del huso ([Figuras 1 y 2](#))

Para recolectar complejos de ovocitos (COC) de cúmulos en etapa de vesícula germinal (GV) para contar y para *en vivo* maduración para la evaluación de la morfología del huso, ambos ovarios de cada ratón se recuperaron 44 a 46 horas después de la estimulación ovárica con 7,5 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) (MSD Animal Health, Australia), que se administró mediante inyección intraperitoneal (ip). La grasa y el tejido que rodeaba los ovarios se extrajeron cuidadosa y rápidamente bajo el microscopio. Los ovocitos se liberaron mecánicamente de los ovarios en medio M2 suplementado con 3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) en presencia del inhibidor del crecimiento 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma Aldrich, Australia) a 50°C. metroM con aguja calibre 27. Los ovocitos liberados, incluidos los complejos de ovocitos del cúmulo (COC) y los ovocitos desnudos (DO) en la etapa de vehículo germinal (GV), se recogieron con tubos aspiradores (Sigma Aldrich) y se transfirieron a otra gota de medio IBMX-M2 cubierto con aceite de parafina (EMD). Millipore Corporation, EE. UU.), que se precalentó a 37-C. A continuación, se contaron los ovocitos y se eliminaron las células del cúmulo mediante rotura mecánica con una pipeta bucal. Luego, los ovocitos se enjuagaron 3 veces en IBMX-free M2 (Sigma Aldrich, Australia) que contenía 3 mg/ml de BSA, luego de 24 horas de calibración del pH en CO al 5 %., para lavar el IBMX de los ovocitos, luego transferirlo a otro medio M16 limpio y calibrado con pH

que se cubrió con aceite y se devolvió a la incubadora bajo 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ para evaluar el desarrollo meiótico posterior. Las mediciones de maduración meiótica incluyeron las tasas de descomposición de vesículas germinales (GVBD) y la extrusión del primer cuerpo polar (PBE). Las tasas de GVBD se midieron contando el número de ovocitos en los que había una desaparición de las membranas nucleares en las primeras dos horas después de la liberación. Los ovocitos que no se desarrollaron en la etapa GVBD después de 2 horas se descartaron y los ovocitos restantes en la etapa GVBD se incubaron continuamente para evaluar el desarrollo de PBE, indicado por la producción del primer cuerpo polar, en 14 horas, 16 horas y 20 horas después.

Para el análisis de inmunofluorescencia y del huso, los ovocitos que habían logrado la extrusión del cuerpo polar se retiraron del medio de cultivo y se lavaron muy brevemente con solución de PHEM (60 mM PIPES a pH 6,9, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂·7H₂O), antes de prepermeabilizarse en 0,25% Triton X-100 (Sigma) en PHEM durante 5 s a temperatura ambiente para ablandar la zona pelúcida. A continuación, los ovocitos se fijaron en paraformaldehído al 3,7 % (Sigma) en PHEM durante 20 minutos antes de permeabilizarlos durante 10 minutos en Triton X-100 al 0,25 % en PBS. A continuación, los ovocitos se lavaron en PBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 0,5 % (Sigma) (solución de lavado) durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de bloquearlos durante la noche en PBS que contenía BSA al 3 % y Tween-20 al 0,05 % (solución de bloqueo) a 4°C. A la mañana siguiente, se permitió que los ovocitos alcanzaran la temperatura ambiente y se probaron con anticuerpos primarios.

Para el inmunomarcaje, anticuerpos humanos anticentrómero (ACA; 1:40; ImmunoVision) y; ratón anti-B-Se utilizó tubulina (1:800; Sigma) para etiquetar cinetocoros y microtúbulos, respectivamente. Después de la incubación del anticuerpo primario, los ovocitos se lavaron y colocaron en los siguientes anticuerpos secundarios: antihumano de cabra marcado con Alexa Fluor 546 (1:200; Invitrogen) para detectar ACA; y anti-ratón de cabra marcado con Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen) para detectar B-tubulina. El ADN se marcó mediante una incubación de 60 s en Hoechst 33342 (1 metrog/ml; bis-benzimida; Sigma) en PBS a temperatura ambiente. Luego, los ovocitos se transfirieron a 1-2 metroL microgotas de PBS bajo aceite mineral en platos con fondo de vidrio para imágenes confocales.

Se capturaron secciones Z en serie de ovocitos fijados a 0,5 metrointervalos de m, para abarcar toda la región del huso, usando un microscopio confocal multifotónico A1 MP+ (Nikon, Japón) equipado con un objetivo de inmersión en aceite C-Apochromat 63x/1.4 NA, y procesado usando el software de adquisición y análisis NIS-Elements C (Nikon, Japón). Se proyectaron pilas de imágenes confocales y se procesaron posteriormente utilizando el software de imágenes FIJI.

Para los análisis del huso, los ovocitos que exhibían husos bipolares en forma de barril con fibras de microtúbulos bien organizadas, junto con cromosomas estrechamente alineados en la placa metafásica, se consideraron normales. Los husos desordenados y los cromosomas rezagados se consideraron anormales. Para cegar al investigador al análisis, a los ovocitos se les dio un código de color para cada placa para la obtención de imágenes y la puntuación, estos códigos de colores correspondían a un grupo de tratamiento que estaba cegado al investigador hasta después de la obtención de imágenes y la puntuación.

Tratamiento con Monastrol y evaluación de la ploidía

Después de la maduración in vitro, los ovocitos MII se cultivaron durante 2 h en medio M2 (Sigma) que contenía 100 metroM monastrol (Sigma), un inhibidor de la kinesina-5 que se usa para alinear los cromosomas para investigaciones del número y la dinámica de los cromosomas (Kapoor et al., 2000). A continuación, los ovocitos se fijaron, bloquearon e inmunotearon como se describe en la sección anterior. Los cinetocoros se detectaron usando anticuerpo primario anticentrómero humano (ACA; ImmunoVision), seguido de incubación en antihumano de cabra marcado con Alexa Fluor 546 (1:200; Invitrogen). El ADN se marcó utilizando una incubación de 10 minutos en una dilución 1:5000 de tinción de ácido nucleico Sytox Green (Invitrogen). Las imágenes se adquirieron a 0,5 metro intervalos usando el microscopio descrito anteriormente y procesado usando el software FIJI.

Para obtener un recuento de cromosomas en cada ovocito, se analizó inicialmente la imagen de proyección Z para determinar el número de pares de cinetocoros. Cuando hubo una posible superposición de cinetocoros o equívocos, se analizaron secciones confocales en serie mientras se observaba cuidadosamente la orientación de los cromosomas. Los ovocitos con excesiva acumulación de cromosomas y aquellos con recuentos ambiguos se excluyeron de la evaluación final de aneuploidía. Un solo observador entrenado realizó todos los cálculos y la determinación de la ploidía. Los grupos de tratamiento estaban cegados al investigador hasta después de la determinación de la ploidía, mediante el uso de un código de color que correspondía a un grupo de tratamiento que estaba cegado al investigador hasta después de la obtención de imágenes y el análisis.

Recolección de ovocitos e imágenes confocales: tinción DCFDA

Para recolectar AOC MII maduros, los ratones fueron superovulados con una inyección intraperitoneal (ip) de 10 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (Folligon; Intervet, Boxmeer, Holanda) para estimular el crecimiento del folículo, seguido de una inyección ip de 10 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Chorulon, MSD Animal Health, Australia) 46 h más tarde para inducir la ovulación. Los COC se recolectaron de ampollas oviductales usando una aguja de calibre 27 y se recolectaron en tampón HEPES.a-medio esencial mínimo (a-MEM; GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY) complementado con 3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma Aldrich, St Louis, MO) 14 a 16 h después de la inyección de hCG.

Para evaluar la respuesta de los mecanismos de defensa del estrés oxidativo de los ovocitos, se evaluaron los niveles de glutatión (GSH) y especies reactivas de oxígeno (ROS) intraovocitos utilizando las sondas fluorescentes 5-(y-6)-clorometil-2-diacetato de ,7'-diclorodihidrofluoresceína (CM-H₂ DCFDA) (Invitrogen). En ovocitos no desafiados como se muestra en [Figura 1E](#), como se describió anteriormente (Li et al.,

2016), los ovocitos MII se despojaron mecánicamente de sus células del cúmulo antes de la tinción y la obtención de imágenes. Los ovocitos se incubaron en tampón tamponado con HEPESa-MEM que contiene 10 metroM CM-H₂DCFDA durante 30 minutos a los 37°C protegido de la luz. Los ovocitos se lavaron tres veces en tampón HEPESa-Medio MEM antes de la transferencia a un 2 metroL gota de HEPES tamponado a-Medio MEM, cubierto con aceite de parafina en un plato confocal de 35 mm con fondo de vidrio (MatTek Corp.). Se tomaron imágenes de los ovocitos inmediatamente bajo un campo brillante y fluorescencia usando un microscopio confocal Nikon A1+ usando un objetivo de 20X a 37°C para H₂O₂ ovocitos desafiados como se muestra en [Figura S1D](#), los complejos de ovocitos del cúmulo GV se recuperaron de animales estimulados con PMSG y se denudaron mecánicamente, y se incubaron durante la noche en a-MEM con 50 metroM IBMX en un 5% de CO₂ incubadora a las 37°C. A continuación, los ovocitos se incubaron en tampón HEPES a-MEM con IBMX con la adición de 25 metroM H₂O₂, luego se lavó tres veces y se dejó recuperar en tampón HEPES a-MEM con IBMX durante 90 min y teñido durante 30 min en tampón HEPES a-MEM con IBMX que contiene 10 metroMDCFDA. Luego se lavaron los ovocitos y se tomaron imágenes inmediatamente mediante microscopía confocal a 37°C. Escisión de CM-H inducida por ROS: La fluorescencia DCFDA a DCF se examinó utilizando una longitud de onda de excitación y emisión de 488 nm y 520 nm. Las imágenes se tomaron en condiciones fijas con respecto a la energía del láser, la detección de la señal (ganancia) y el tamaño del agujero de alfiler. Pilas confocales z de 10 metroM espesor con 1 metroSe registraron m incrementos entre cortes en la llanura ecuatorial de los ovocitos. Las intensidades de fluorescencia relativas medias de DCF se midieron en un mínimo de 25 ovocitos por grupo utilizando el software ImageJ Fiji ([Schindelin et al., 2012](#)).

FIV y cultivo de embriones

La competencia de desarrollo de los ovocitos se evaluó examinando la capacidad de los ovocitos para apoyar el desarrollo embrionario previo a la implantación después de *in vitro* fertilización (FIV). La FIV y el cultivo de embriones se realizaron como se describió previamente por [Yeo et al. \(2008\)](#). Todos los medios de FIV se adquirieron de IVF Vet Solutions (Adelaide, Australia). Brevemente, después de la estimulación de hembras con 5 UI (jóvenes) o 10 UI (ancianos) de PMSG y hCG, se recolectaron AOC de ampollas oviductales usando una aguja de calibre 27 y se recolectaron en tampón HEPES. a-Los AOC del medio mínimo esencial se lavaron tres veces en medios de lavado (Research Wash) suplementados con 4 mg/ml de BSA y se incubaron con espermatozoides capacitados en medios de fertilización suplementados con 4 mg/ml de BSA durante 4 h a 37°C con 5% O₂, 6% CO₂ y 89% N₂. Se recuperó esperma de machos híbridos CBB6F1 > 12 semanas de edad. Los presuntos cigotos se lavaron tres veces en medios de lavado y luego una vez en medios de escisión (Research Cleave) suplementados con 4 mg/ml de BSA y se cultivaron en gotas recubiertas con aceite mineral a una densidad de 1 embrión por 2 metroL. Las tasas de fertilización y el posterior desarrollo a tiempo se evaluaron cada 24 horas.

En el caso de condiciones de crecimiento de medios definidos simples ([Figuras 4C-E, S5C, S5G y S5H](#)), los ovocitos se recolectaron como se indicó anteriormente y luego se mantuvieron en líquido tubárico humano suplementado con glutamina y EDTA (HTF-GE). no contiene hormonas ni ligandos tróficos ([O'Neill, 1997](#)). Los embriones se cultivaron individualmente en 10 metroL cae para inducir aún más el estrés del cultivo al diluir los ligandos tróficos autocrinos. Los embriones se fijaron a las 92 horas después de la fertilización para el recuento de células.

actividad de G6PD

Los ovocitos de GV de animales estimulados con PMSG se recuperaron de los ovarios y se les quitó mecánicamente la capa del cúmulo mediante pipeteo con la boca, y se recogieron en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,44 en un volumen de 35 metroL con 5 ovocitos por muestra. Los ovocitos se lisaron siguiendo un único ciclo de congelación-descongelación y se centrifugaron a 16.000 g, 4 grados durante 10 minutos para separar los restos celulares. El sobrenadante (34 metroL) se sometió a la medición de la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que se determinó como se describió anteriormente ([Tian et al., 1998](#)). Tanto la actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) como la actividad de G6PD+6PGD se midieron por separado, y la actividad de G6PD endógena se determinó restando la actividad de 6PGD sola del valor de actividad enzimática total de G6PD+6PGD. Cada mezcla de reacción consta de Tris-HCl 50 mM, pH 7,44, NADP 2 mM+ y muestra en la que se iba a medir la actividad de G6PD. Las reacciones se iniciaron con la adición de G6P 4 mM + 6PGL 4 mM o 6PGL 4 mM solo y la actividad se midió usando un espectrofotómetro a temperatura ambiente, en un volumen total de 60 metroL en una placa de 384 pocillos. La producción de NADPH se midió a una absorbancia de 340 nm cada 30 s, y la tasa de síntesis de NADPH se determinó como una unidad de AU/hora.

NAD+ mediciones

En [Figuras 1C y 1D](#), NAD⁺ y NADH se midieron por espectrometría de masas. Después de la eutanasia, los ovarios se diseccionaron rápidamente, se extrajo la grasa, se pesaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, y luego se almacenaron a -80°C. Los ovarios se colocaron en metanol al 80 % enfriado con hielo, se sonicaron en hielo durante 2 3 30 s, incubado a -30°C durante 20 min y luego se centrifuga a 14.000 *gramo* durante 10 minutos a las 4°C. El sobrenadante se recogió y se añadió a un volumen fijo de mezcla estándar interna (Nicotinamida-d₄; B-sal de diamonio NADH-d₅; B-NADd₄, de Toronto Research Chemicals, Canadá) y se secó mediante centrifugación al vacío. Las muestras se reconstituyeron en NH 100 mM₄OAc y filtrado a través de un 0.22 metrofiltro m. Los metabolitos se cuantificaron por LC-MS/MS como se describe por [Bustamante et al. \(2017\)](#) con modificaciones menores. Brevemente, los metabolitos se separaron en un Phenomenex NH₂ columna (150 mm x 2 mm x 3 metroM) utilizando un gradiente de solvente binario que consiste en NH 5 mM₄OAc (pH 9,5 ajustado con amoníaco) y acetonitrilo con un caudal de 250 metroL/min. Los metabolitos se midieron usando un espectrómetro de masas TSQ Access (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Las curvas de calibración de los metabolitos individuales se construyeron utilizando las proporciones del área del pico (área del pico del metabolito dividida por

área del pico del estándar interno seleccionado) de cada calibrador frente a su concentración. Los estándares internos seleccionados fueron los siguientes: Nicotinamida-d4 para nicotinamida; B-NADH-d5 para NADH; B-NAD-d4 para NAD⁺. Las concentraciones de los metabolitos endógenos en los extractos de tejido se obtuvieron a partir de estas curvas de calibración. Los datos se normalizaron al peso de los ovarios. Los espectros se procesaron y las áreas de los picos se integraron utilizando el software Xcalibur (versión 2.2, 2011, ThermoFisher Scientific). El procesamiento de datos se realizó utilizando la función LCQuan del software. Los conjuntos de datos sin procesar están disponibles en nuestro [sitio de mendeley](#).

El tamaño de la muestra para las mediciones de NAD por espectrometría de masas (arriba) se determinó mediante cálculos de potencia basados en los resultados piloto obtenidos utilizando el NAD descrito anteriormente. + método de ciclismo de [Zhu y Rand \(2012\)](#). Estos cálculos de potencia, y los resultados piloto que informaron el tamaño del efecto, están disponibles en la sección separada [Información suplementaria](#). En estos estudios piloto, después de la eutanasia, los ovarios se diseccionaron rápidamente de los animales y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido, luego se almacenaron a -80°C. A continuación, las muestras se homogeneizaron en NAD⁺ tampón de extracción (nicotinamida 10 mM, Tris HCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1 %, pH 7,4) mediante sonicación. A continuación, las muestras se centrifugaron a 7000 g durante 5 min a 4°C para eliminar los residuos insolubles. Se tomaron alícuotas para el posterior ensayo de proteínas y luego las muestras se pasaron a través de filtros Amicon de 10 kDa a 14.000 g, 30 min a 4°C para eliminar las proteínas de la muestra. El flujo de estas muestras que contenían metabolitos sin proteínas se dividió en dos alícuotas. Para evaluar NAD⁺ solo, en una de estas alícuotas se añadió HCl a 10 mM y las muestras se calentaron a 70°C durante 30 min: este paso degrada NADH, dejando atrás NAD⁺. Cada muestra se midió por triplicado técnico, con 25 µL muestra añadida a 100 µL Mezcla cíclica L ADH (0,2 mg/ml de enzima alcohol deshidrogenasa, etanol al 2%, Tris 100 mM pH 8,5). Las muestras se dejaron ciclar durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de 50 µL adición de una solución de MTT/PMS (metosulfato de fenazina 0,1 mM, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio 0,8 mM), Tris-HCl 100 mM pH 8,5). Luego se incubaron las placas y se midió la absorbancia a 570 nm cada 5 min durante la reacción de ciclado, con los 10 min. punto de tiempo utilizado para los datos presentados aquí. Las concentraciones de NAD se extrapolaron a partir de una curva estándar y se normalizaron a concentraciones de proteína determinadas mediante un ensayo de proteína BCA.

Imágenes hiperespectrales

En este trabajo, utilizamos un microscopio de fluorescencia adaptado para imágenes multispectrales agregando una serie de canales fluorescentes personalizados ([Gosnell et al., 2016a, 2016b; Habibalahi et al., 2019; Rehman et al., 2017](#)) para caracterizar la fluorescencia nativa de los ovocitos. Las imágenes se tomaron en los siguientes canales enumerados en la siguiente tabla. Generamos una secuencia de imágenes de autofluorescencia de las mismas células en cada uno de estos canales con un aumento de 40 veces (40x). Para adquirir las imágenes de fluorescencia, se utilizó una cámara sensible (Prime 95B CMOS de Photometrics). La cámara fue operada por debajo de -65°C para reducir el ruido inducido por el sensor.

Para preparar imágenes espectrales para el análisis cuantitativo y la separación espectral, primero se llevó a cabo un procedimiento de preparación de imágenes de varios pasos ([Gosnell et al., 2016a, 2016b; Mahbub et al., 2017; Vidal y Amigo, 2012](#)). Este procedimiento elimina las fuentes de errores, reduce el ruido y estandariza las imágenes espectrales. Estos pasos incluyen (i) equalización de imagen, (ii) eliminación de ruido, (iii) aplanamiento de la iluminación de fondo y (iv) segmentación de celdas que se informó en detalle en nuestros estudios anteriores ([Mahbub et al., 2017](#)). Brevemente, para igualar las imágenes, el valor de intensidad en cada canal se convierte en unidades de fotones por píxel por segundo (PPS). PPS une estandariza las imágenes adquiridas con diferentes parámetros de adquisición, como la eficiencia cuántica de la cámara y el tiempo de exposición. A continuación, para reducir los ruidos aleatorios, como los picos y el ruido de Poisson, se emplearon una "ventana límite de umbral" y un filtro de ondículas, respectivamente.

Además, se capturaron dos imágenes multispectrales de referencia que incluyen agua y calibración utilizando nuestro sistema de microscopio multispectral al comienzo de cada experimento. Después de eliminar el ruido, la imagen del agua se restó de las imágenes espectrales para eliminar las señales de autofluorescencia inevitables del portaobjetos del microscopio, las placas de Petri, la suciedad de los sensores, etc., lo que forma una contribución de fondo de autofluorescencia aditiva a todas las imágenes espectrales. El microscopio se calibró con un fluorímetro (FluoroMax Plus-C, Horiba). Para ello utilizamos el fluido de calibración que es una mezcla de 30 µM NADH (rendimiento cuántico 0,019) y 5 µM Riboflavina M (rendimiento cuántico 0,24) con respuesta fluorescente distinta de cero en todos nuestros canales espectrales. El espectro de fluorescencia de este fluido se mide con un fluorímetro y se refleja en el microscopio multispectral en todos nuestros canales espectrales. A continuación, se suavizaron las imágenes de fluorescencia del fluido de calibración y se minimizaron los ruidos aleatorios asociados. Las imágenes espectrales suavizadas con el fondo de agua restado, luego se dividieron por la imagen del fluido de calibración y se multiplicaron por la respuesta de fluorescencia del fluido de calibración medida por el fluorímetro. Esto se hizo canal por canal. Finalmente, para realizar el proceso de desmezclado con una resolución de una sola célula, las células se aislaron manualmente (segmentadas) usando su imagen DIC superpuesta en imágenes de autofluorescencia seleccionadas.

En el proceso de desmezcla, las características espectrales medidas de las células se compararon con los espectros de referencia de fluoróforos específicos para encontrar su abundancia. En este estudio, la desmezcla se realizó según un modelo de mezcla lineal (LMM). El LMM describe que la señal fluorescente de cada píxel es una combinación lineal de una fracción de los espectros de los componentes de los extremos. LMM define pesos asociados con la concentración de las moléculas correspondientes a estos espectros de componentes. Estas concentraciones se presentaron como fracciones de abundancia ([Keshava, 2003; Keshava et al., 2000; Keshava y mostaza, 2002](#)) y el Análisis de Componentes Dependientes Robustos ([Mahbub et al., 2017](#)) (RoDECA) algoritmo (disponible en nuestro [sitio de mendeley](#)) se empleó para identificar los fluoróforos nativos dominantes y calcular su abundancia relativa. Todos los conjuntos de datos sin procesar están disponibles en nuestro [sitio de mendeley](#).

Canal espectral	Excitación longitud de onda (nm)	Longitud de onda de emisión (ancho de banda) (nm)	Espejo dicróico pase largo (nm)	Potencia en objetivo(metroW)	Exposición tiempo (s)
1	345 ± 5	414 (46)	389	6.0	10
2	345 ± 5	451 (106)	389	6.2	6
3	345 ± 5	575 (59)	552	5.7	10
4	358 ± 5	414 (46)	389	5.2	10
5	371 ± 5	414 (46)	389	6.8	10
6	358 ± 5	451 (106)	389	5.2	10
7	371 ± 5	451 (106)	389	6.9	10
8	358 ± 5	575 (59)	552	6.3	10
9	371 ± 5	575 (59)	552	9.9	10
10	377 ± 5	575 (59)	552	18.6	10
11	437 ± 5	575 (59)	552	28.8	10
12	457 ± 5	575 (59)	552	25.2	10
13	476 ± 5	575 (59)	552	24.1	10
14	358 ± 5	594 (pase largo)	552	6.7	10
15	371 ± 5	594 (pase largo)	552	10.4	10

Especificación espectral de los canales utilizados en este estudio

Alimentación rica en grasas

Los animales se mantuvieron con pienso o dietas ricas en grasas como se describió anteriormente (Wu et al., 2014). La dieta Chow (Gordon's Specialty Stock Feeds, Yanderra, Nueva Gales del Sur, Australia) comprendía un 8 % de calorías de grasas, un 21 % de calorías de proteínas y un 71 % de calorías de carbohidratos, con una densidad energética total de 2,6 kcal/g. La dieta rica en grasas (HFD, por sus siglas en inglés) se preparó internamente y comprendía un 45 % de calorías de grasa (manteca de res), un 20 % de calorías de proteínas y un 35 % de calorías de carbohidratos con una densidad de 4,7 kcal/g, según la dieta de roedores D12451 (Research Diets, New Brunswick, NJ, EE. UU.).

estudios de descendencia

Descendencia masculina de los grupos de control y NMN solo tratados de los ensayos de reproducción que se muestran en figura 3A se mantuvieron para determinar si la exposición materna a NMN afectó negativamente la salud de la descendencia. La exposición a NMN en las madres continuó en el agua potable (2 g/L) desde las 16 semanas de edad, incluso durante el apareamiento, el embarazo y la lactancia. Las crías se destetaron con agua potable normal sin NMN, y con una dieta de comida estándar o una dieta rica en grasas. Los animales se sometieron a análisis de composición corporal y pruebas de tolerancia a la glucosa a las 10 semanas de edad, y análisis de comportamiento a los 5 meses de edad.

Prueba de preferencia de sacarosa (SPT)

La prueba de preferencia de sacarosa es una prueba estándar para evaluar el comportamiento anhedónico, un síntoma de depresión. Esta prueba se realizó a los 5 meses de edad en crías machos de hembras tratadas con NMN según un estudio previo con algunas modificaciones (Maniam y Morris, 2010). Los ratones se alojaron individualmente en jaulas separadas con acceso a dos botellas. Los ratones se preexpusieron primero a una solución de sacarosa (1 %, p/v) durante 24 h como entrenamiento para adaptarse a la solución de sacarosa recién introducida. Se les dio acceso a 2 botellas (sacarosa al 1%, agua del grifo). En el segundo día, se retiraron el alimento y el agua durante 6 horas antes de dar acceso nuevamente a la sacarosa y al agua. Para evitar la preferencia de lugar, se cambió la posición de las botellas, y los ratones recibieron solución de sacarosa al 1% y agua durante 24 h. La preferencia de sacarosa se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: preferencia de sacarosa (%) = ingesta de sacarosa (g) / [ingesta de sacarosa (g) + agua (g)] x 100%

Prueba de luz/oscuridad

La prueba de luz/oscuridad (LDT) es una prueba estándar para evaluar el comportamiento similar a la ansiedad. Esta prueba se realizó durante la fase de luz a los 5 meses de edad según un protocolo previo (Maniam y Morris, 2010). El aparato LDT constaba de compartimentos de metacrilato brillante y oscuro (24 cm 24 cm 27 cm) conectados por una pequeña abertura (10 cm 10 cm). La lectura de luz en el piso del área iluminada fue de 4000 a 5000 lux y el área oscura se iluminó entre 1 y 10 lux. Los ratones se colocaron suavemente en el área iluminada, de espaldas a la entrada. El tiempo total pasado en áreas claras y oscuras se registró durante 5 min. El porcentaje de tiempo pasado en la luz se calculó utilizando la siguiente fórmula: % de tiempo en el área de luz = tiempo pasado en la luz / [(tiempo pasado en la oscuridad + tiempo pasado en la luz)].

Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT)

GTT fue como se describió anteriormente (Wu et al., 2014). Los animales estuvieron en ayunas desde las 08:00 horas del día de la prueba. A las 14:00, se analizó la glucosa en sangre inicial utilizando un medidor de glucosa manual (Accu-Check, Roche) a través de una muesca de bisturí a menos de 1 mm de la punta de la cola, con colas que sobresalían de una pequeña caja de cartón boca arriba utilizada para calmar animales. A los animales se les inyectó glucosa al 25% (inyección ip) a 2 g/L de masa corporal magra, y se evaluó la glucosa en los puntos de tiempo indicados a partir de la sangre de la cola. La masa corporal magra se evaluó mediante resonancia magnética cuantitativa.

Medidas de composición corporal

La composición corporal se determinó mediante MRI cuantitativa utilizando un ecomRI (Houston, TX, EE. UU.) en animales conscientes.

Sonda oral y farmacodinamia

A los animales se les administró una sola sonda oral de NMN en un volumen de 100 µL de agua por 20 g de masa corporal para una dosis total de 500 mg/kg. Los animales se sacrificaron en el momento indicado y los ovarios se diseccionaron rápidamente, se limpiaron del tejido adiposo circundante y se congelaron rápidamente para el análisis posterior de NAD⁺ niveles. [Diseño de ensayos de mejoramiento](#)

La capacidad reproductiva de ratones SIRT2-Tg de 16 meses (n = 8) se comparó con la de compañeros de camada de tipo salvaje de la misma edad (n = 8). Empleamos un protocolo de apareamiento cronometrado, en el que cada ronda de reproducción comenzaba con ratones hembra alojados en grupo que eran "perfumados" usando ropa de cama sucia de un macho durante 3 días. Este diseño permitió la estimulación y sincronización de los ciclos estrales de las hembras a través del Efecto Whitten ([Jermolov et al., 1986](#)). A continuación, cada hembra se colocó en una jaula de reproductores de machos probados alojada individualmente en una proporción de 1:1 ("cohabitación"). Esta transferencia se realizó por la tarde, en previsión de la ovulación nocturna (2). La configuración de luz predeterminada de las instalaciones para albergar animales es un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. A la mañana siguiente, se evaluaría la presencia de un tapón vaginal viscoso en cada hembra como evidencia de cópula y, independientemente del estado del tapón, se separarían para evitar el apareamiento durante el día. Las hembras sin enchufe serían reemplazadas por el mismo macho la noche siguiente para pasar otra noche de apareamiento. Si, después de 3 noches consecutivas de cohabitación, no se ha observado ningún enchufe, las hembras se separan y se observa el aumento de peso durante 5 días para tener en cuenta la posibilidad de enchufes perdidos, antes de someterse a un nuevo olfato. Una hembra repetiría la ronda de apareamiento actual hasta que se confirmara un enchufe positivo. Se consideró que las hembras con plug positivo habían pasado esa ronda de apareamiento y serían alojadas por separado antes de someterse a micro-ultrasonido (VisualSonics Vevo 2100 Ultrasound) el día 15 después de la cópula (pc) para determinar el estado de preñez, determinado por la presencia de un feto. latido del corazón. Se consideraría que las hembras que habían copulado, como lo demuestra la presencia del macho, pero que no quedaron preñadas fracasaron en esa ronda de apareamiento y comenzarían la siguiente ronda de apareamiento con un semental macho diferente, y así sucesivamente. El esquema de este experimento se muestra en Se consideró que las hembras con plug positivo habían pasado esa ronda de apareamiento y serían alojadas por separado antes de someterse a micro-ultrasonido (VisualSonics Vevo 2100 Ultrasound) el día 15 después de la cópula (pc) para determinar el estado de preñez, determinado por la presencia de un feto. latido del corazón. Se consideraría que las hembras que habían copulado, como lo demuestra la presencia del macho, pero que no quedaron preñadas fracasaron en esa ronda de apareamiento y comenzarían la siguiente ronda de apareamiento con un semental macho diferente, y así sucesivamente. El esquema de este experimento se muestra en pero no quedó preñada se consideraría que ha fallado esa ronda de apareamiento y comenzaría la siguiente ronda de apareamiento con un semental macho diferente, y así sucesivamente. El esquema de este experimento se muestra en pero no quedó preñada se consideraría que ha fallado esa ronda de apareamiento y comenzaría la siguiente ronda de apareamiento con un semental macho diferente, y así sucesivamente. El esquema de este experimento se muestra en [Información suplementaria \(Métodos S1\)](#). Los datos presentados en [figura 3H](#) muestra la tasa acumulativa de embarazo después de la confirmación del apareamiento como se describe anteriormente.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia de dificultades de parto y canibalismo materno que se encontró en ratones nulíparos de edad avanzada, no pudimos determinar el número de descendientes de cada embarazo en los ratones de edad avanzada. *Sirt2* cohorte transgénica.

El ensayo de reproducción para animales tratados con NMN como se presenta en [Figura 2J](#) usó un protocolo diferente. En este experimento, se trataron hembras ex reproductoras de 12 meses de edad sin tratar con NMN (agua potable, 0,5 o 2 g/l) durante 4 semanas, después de lo cual se introdujo un macho de fertilidad comprobada de manera continua. Los animales se pesaron semanalmente, con un aumento de peso de 5 g indicativo de preñez. Una vez notificados como preñados, los animales fueron monitoreados diariamente para detectar nacimientos vivos. Se registraron la fecha de nacimiento vivo y el número de crías, después de lo cual se extrajeron las crías y se reintrodujo el macho para su posterior reproducción. La proporción acumulativa de animales que lograron nacer vivos se utilizó como resultado principal de este estudio, que duró 9 semanas después de la introducción de los machos. El tratamiento con NMN continuó a lo largo de la fase de prueba de reproducción del estudio.

CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Antes de realizar los estudios, se realizaron cálculos de potencia para determinar el tamaño de la muestra utilizando G*Power 3.1, en función de los tamaños del efecto observados en los estudios piloto preliminares.

Para todos los resultados continuos, los conjuntos de datos se sometieron a la prueba omnibus de normalidad de D'Augusto & Pearson. Si todos los grupos pasaron esta prueba, los datos se analizaron como una prueba t de Student de dos colas (2 grupos), ANOVA (3 o más grupos) o como ANOVA de dos vías con un diseño de estudio 2x2, entre las comparaciones de grupo realizadas por Tukey. prueba de comparación múltiple, como se indica en el texto de las leyendas de las figuras. Los conjuntos de datos no paramétricos se analizaron mediante una prueba U de Mann-Whitney de dos colas (2 grupos) o una prueba de Kruskal-Wallis (3 o más grupos) con comparaciones entre grupos realizadas mediante la prueba de comparación múltiple de Dunn. Los datos se sometieron a detección de valores atípicos mediante la prueba ROUT (Q = 1 % como punto de corte) antes de los análisis. Para conjuntos de datos con resultados binarios, se utilizó una prueba exacta de Fisher de dos caras.

Todos los cálculos estadísticos y conjuntos de datos sin procesar están disponibles en nuestro [sitio de mendeley](#) como archivos .xml (<https://doi.org/10.17632/f27ktnj354.1>). Todos los datos de resultados continuos se presentan como gráficos de violín con valores de mediana y cuartil indicados por líneas de puntos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.1.2.

DISPONIBILIDAD DE DATOS Y CÓDIGOS

Los conjuntos de datos y el código generados durante este estudio están disponibles en un sitio de Mendeley asociado con este documento (<https://doi.org/10.17632/f27ktnj354.1>). Todos los conjuntos de datos cuantitativos se han subido a nuestro [sitio de mendeley](#) como archivos .xml exportados desde Graphpad Prism. Estos archivos incluyen los detalles y los resultados del análisis estadístico asociado como se describe en la sección anterior. También se han subido a este sitio imágenes de microscopía y transferencias occidentales sin recortar. Los datos sin procesar asociados con las imágenes hiperespectrales se han cargado con un archivo "léame" asociado, con lecturas resumidas de cada canal para cada imagen que también se muestran como una hoja de cálculo de Excel separada. El código utilizado para interpretar estos datos utilizando el método RoDECA (Robust Dependent Component Analysis) se ha subido como pseudocódigo.

RECURSOS ADICIONALES

No hay recursos adicionales asociados con este estudio.

Información suplementaria

NAD⁺ La repleción rescata la fertilidad femenina

durante el envejecimiento reproductivo

Michael J. Bertoldo, Dave R. Listijono, Wing-Hong Jonathan Ho, Angelique H. Riepsamen, Dale M. Goss, Dulama Richani, Xing L. Jin, Saabah Mahbub, Jared M. Campbell, Abbas Habibalahi, Wei-Guo Nicholas Loh , Neil A. Youngson, Jayanthi Maniam, Ashley SA Wong, Kaisa Selesniemi, Sonia Bustamante, Catherine Li, Yiqing Zhao, Maria B. Marinova, Lynn-Jee Kim, Laurin Lau, Rachael M. Wu, A. Stefanie Mikolaizak, Toshiyuki Araki , David G. Le Couteur, Nigel Turner, Margaret J. Morris, Kirsty A. Walters, Ewa Goldys, Christopher O'Neill, Robert B. Gilchrist, David A. Sinclair, Hayden A. Homer y Lindsay E. Wu

Información suplementaria

NAD+ la repleción rescata la fertilidad femenina durante el envejecimiento reproductivo
Bertoldo, Listijono y Ho y *otros*

Figura complementaria S1

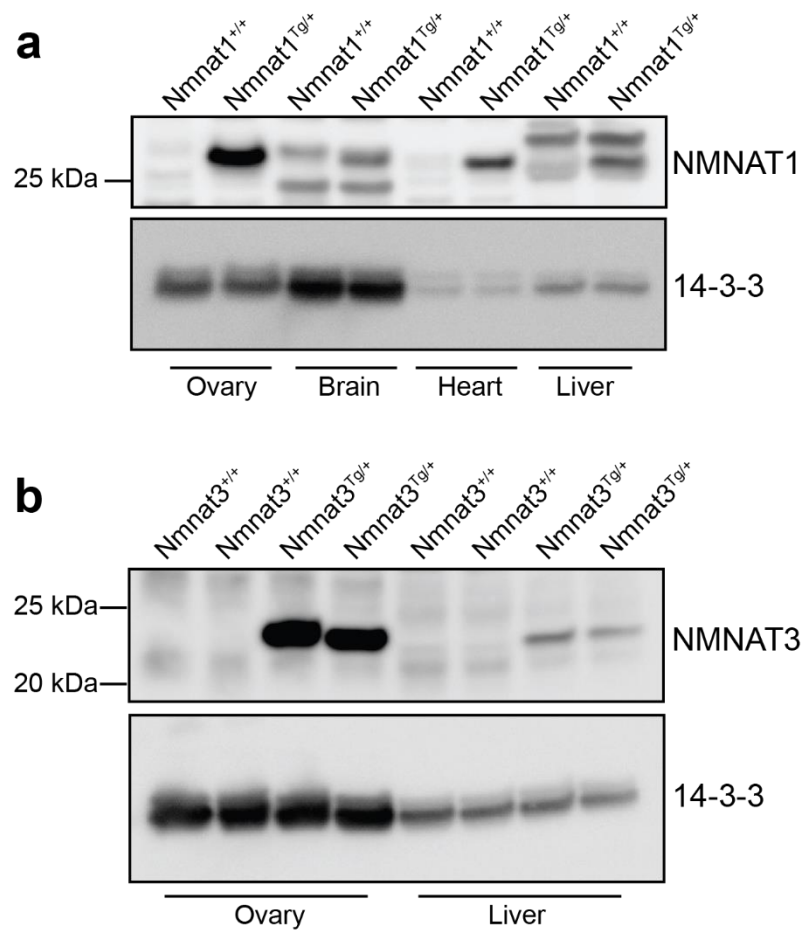


Figura complementaria S1. Sobreexpresión transgénica de NMNAT1 y NMNAT3 en ovarios Relacionado con la Figura 2. Western blot para (a) NMNAT1 en los ovarios de *Nmnat1^{Tg/+}* animales, y (b) NMNAT3 en los ovarios de *Nmnat3^{Tg/+}* animales. Cada carril representa tejido de un animal separado.

Figura complementaria S2

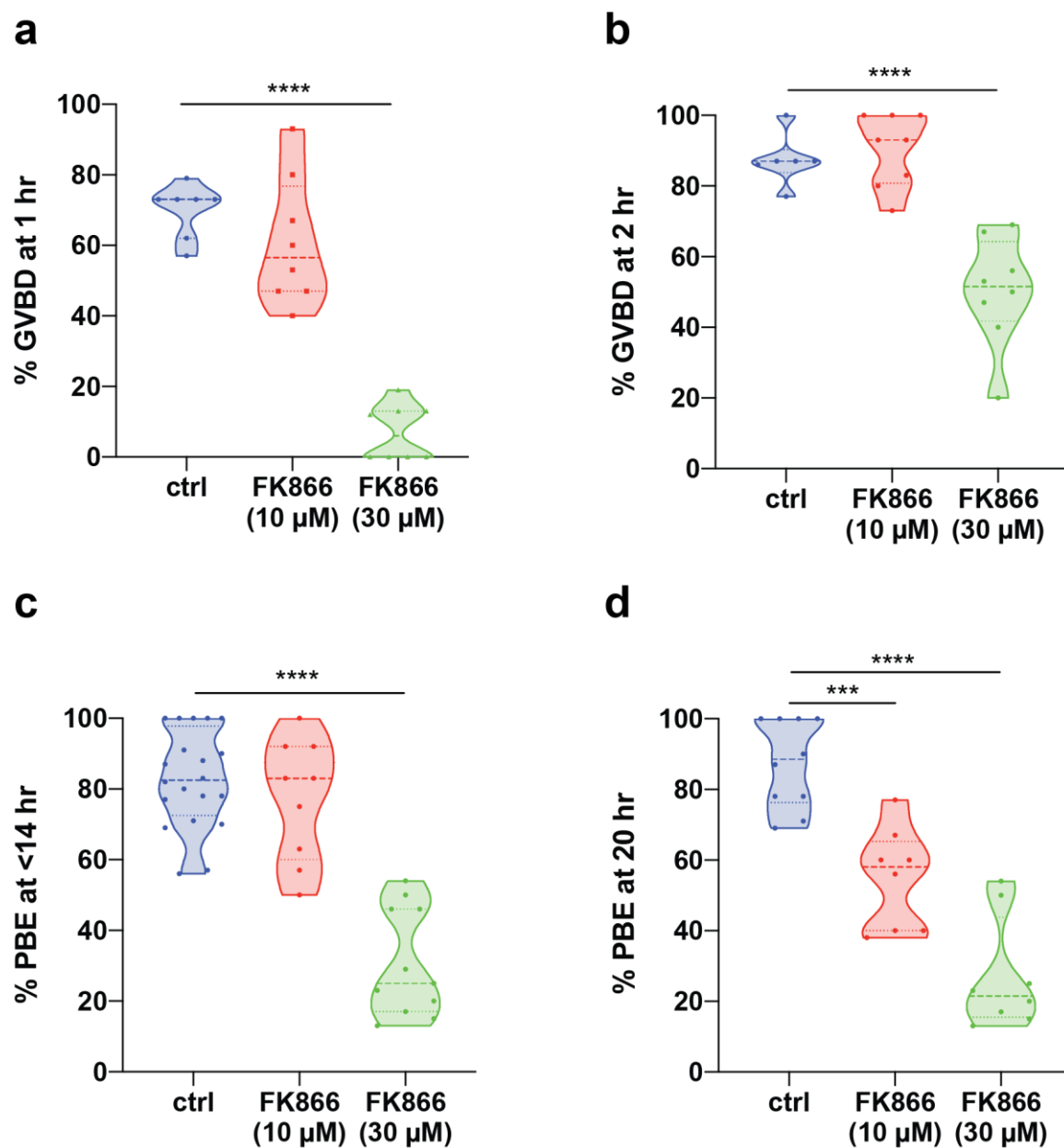


Figura complementaria S2. La inhibición de la síntesis de NAD ralentiza la progresión meiótica. Relacionado

a la Figura 2. Los ovocitos en estadio GV recolectados de hembras C57BL6 de 8 semanas de edad se trataron con se evaluaron las concentraciones indicadas del inhibidor de NAMPT FK866 y la progresión meiótica.

FK866 redujo la descomposición de vesículas germinales (GVBD) en (a) 1 h ($F(2, 20) = 57,53$, $*p < 0,0001$)

y (b) 2 h ($F(2, 19) = 26,72$, $*p < 0,0001$), así como extrusión de cuerpo polar (PBE) en (c) 14 h

($F(2, 37) = 45,39$, $*p < 0,0001$) y (d) 20 h ($F(2, 23) = 40,61$, $*p < 0,0001$). Datos analizados por

ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Dunnett, $n = 9-11$ por grupo como lo indica

puntos de datos que se muestran en los gráficos.

Figura complementaria S3

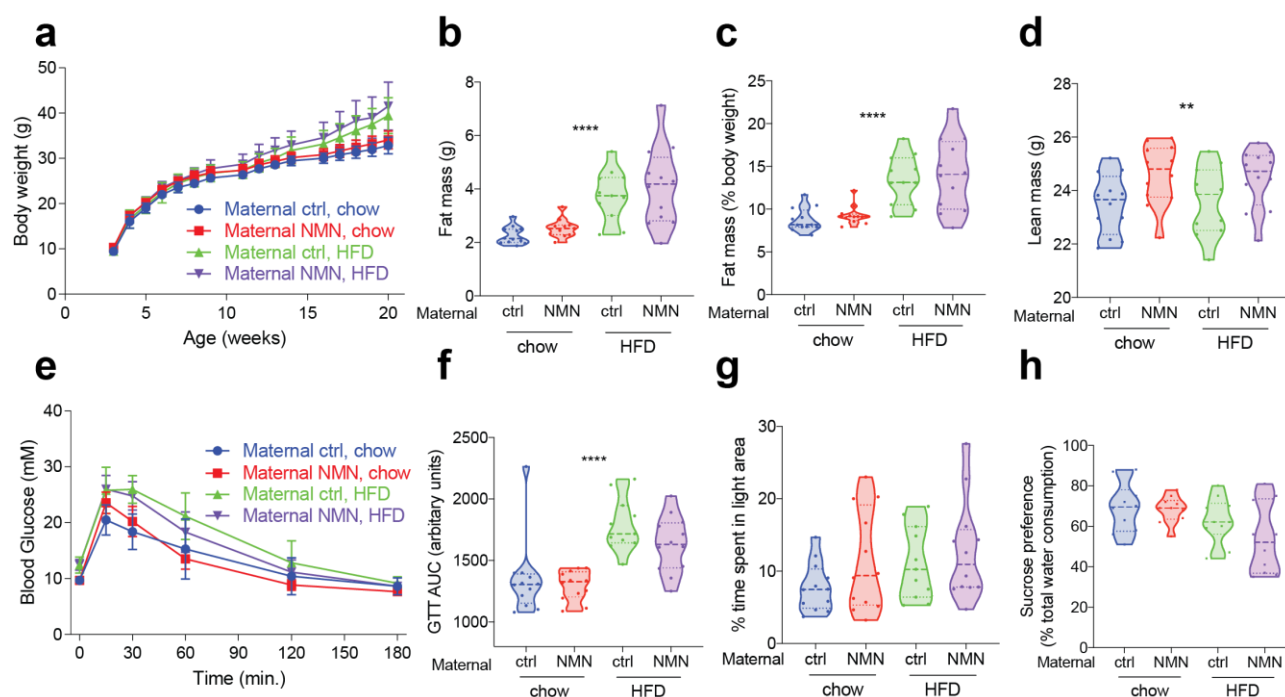


Figura complementaria S3. El tratamiento de la NMN materna no afecta el crecimiento ni el metabolismo

o el comportamiento en la descendencia. Relacionado con la Figura 2. Hijos machos de hembras tratadas con o sin NMN antes del apareamiento, durante el embarazo y durante la lactancia se mantuvieron en comida estándar o dietas altas en grasas (HFD). **a** El peso corporal se midió de forma continua. **B**, Masa grasa y **(C)** masa corporal magra, también expresada como **(D)** la composición corporal fueron evaluadas por MRI cuantitativa, con una diferencia en la masa grasa de HFD pero sin efecto de NMN materno tratamiento (*****p*ags<0.0001 efecto dieta, dieta *F*= 32), y un aumento pequeño pero significativo en magra masa corporal (***p*ags=0,0054 efecto NMN materno, dieta *F*=0,0096, NMN materno *F*=8,604) con tratamiento de NMN materna. La homeostasis metabólica se midió mediante **(mi)** prueba de tolerancia a la glucosa, cuantificado por **(F)** área bajo la curva (AUC) (*****p*<0,0001, efecto de la dieta). El comportamiento era evaluado por el **(gramo)** prueba de caja clara/oscura para el comportamiento similar a la ansiedad, y la **(h)** preferencia por la sacarosa Prueba de comportamiento similar a la depresión. ANOVA de 2 vías, *norte*=11-12 por grupo. Los datos se presentan como gráficos de violín con valores de mediana y cuartil indicados por líneas de puntos.

Figura complementaria S4

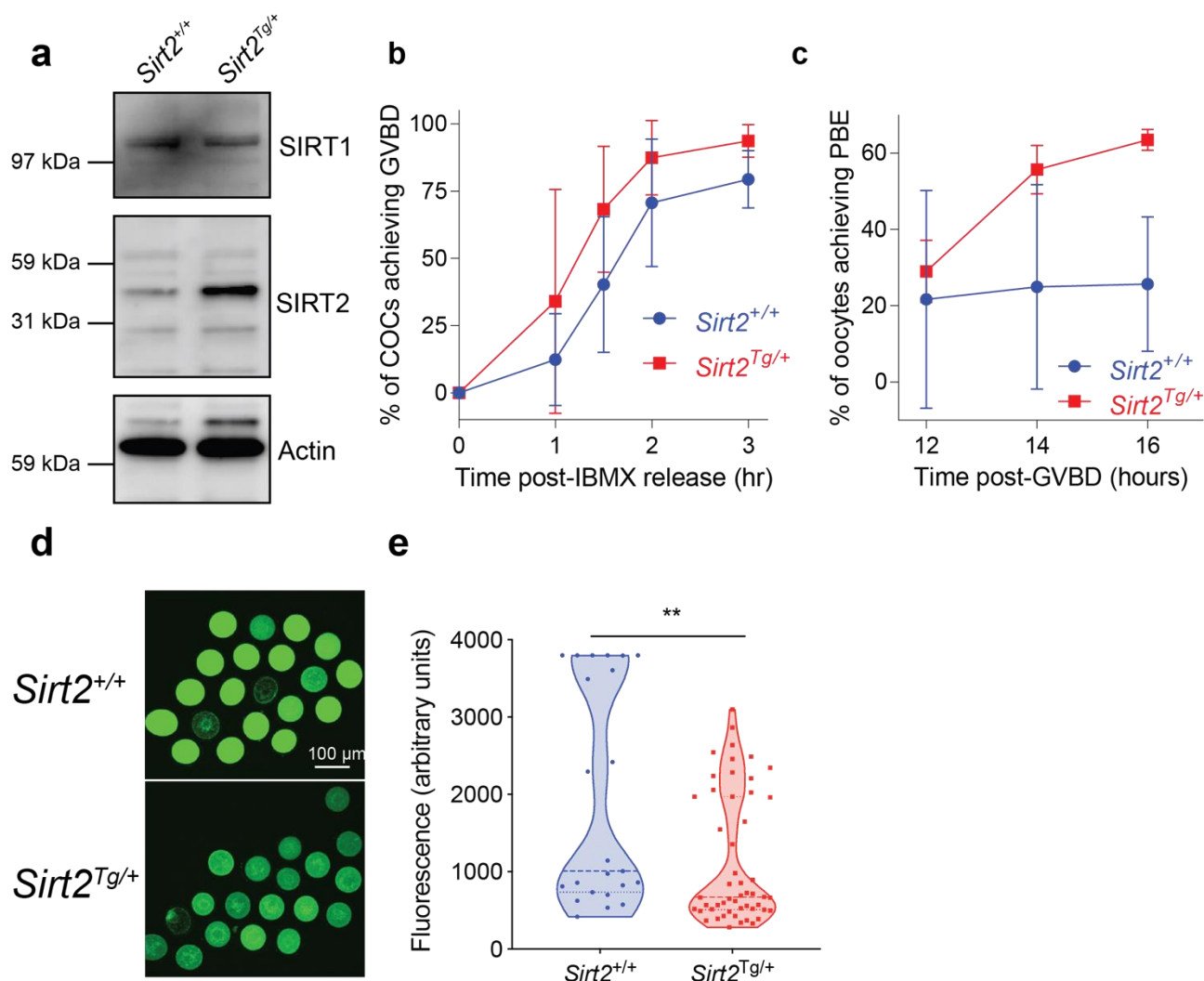


Figura complementaria S4. Relacionado con la figura 3. **a**, Western blot para SIRT2 en ovocitos de todo el cuerpo *Sirt2* ratones transgénicos que sobreexpresan (40 ovocitos por carril). **B**, Vesícula germinal desglose y **(C)** tasas de extrusión de cuerpos polares en ovocitos de 14 meses de edad *Sirt2*^{Tg/+} o salvaje- escribe *Sirt2*^{+/+} compañeros de camada, en los momentos indicados (*norte*=3-5 experimentos). **D**, ovocitos de *Sirt2*^{Tg/+} los animales han mejorado la resistencia al desafío de las especies reactivas de oxígeno (ROS) después de H₂O₂ tratamiento en comparación con los ovocitos de tipo salvaje *Sirt2*^{+/+} compañeros de camada, medidos por H₂DCFDA tinción, cuantificada en **mi** (***p*ags=0.0024, *norte*=23-52 ovocitos por grupo). Los datos son medias ± sd detalle estadístico en la Tabla de Datos Extendidos 1.

Figura complementaria S5

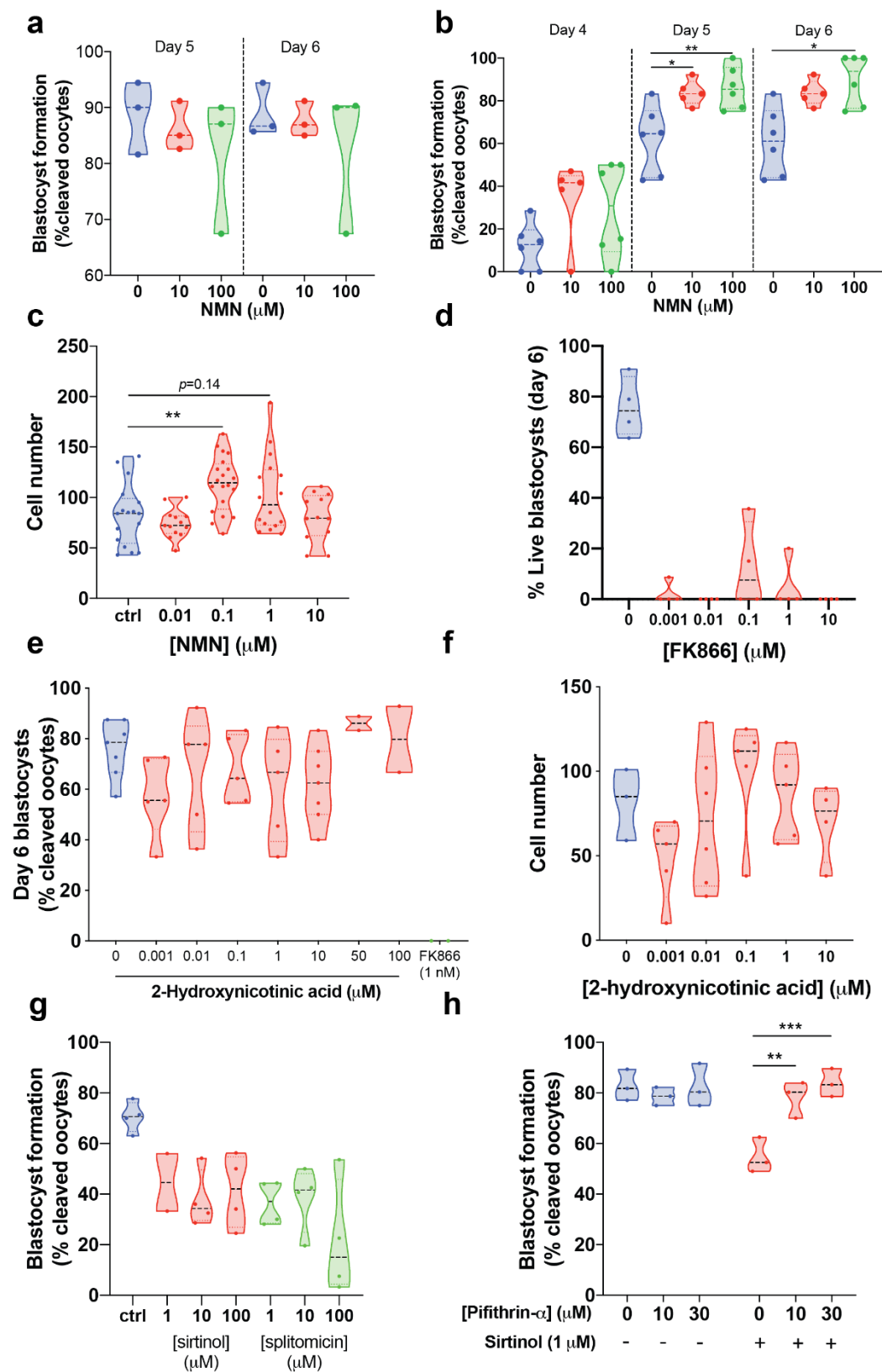


Figura complementaria S5. Relacionado con la Figura 4. La NMN mejora la formación de embriones a partir de no hembras jóvenes. ovocitos de (a) 4 semanas de edad o (B) Se sometieron hembras de 12 meses

a la FIV, con la adición de NMN en las concentraciones indicadas a los medios embrionarios. Blastocisto las tasas de formación se evaluaron como se indica. Datos analizados dentro de cada día por unidireccional ANOVA con comparación múltiple de Kruskal-Wallis. Día 5, 0 contra 10, $p_{\text{ags}}=0,0466$; 0 contra 100, $p_{\text{ags}}=0.0132$. Día 6, 0 contra 100, $p_{\text{ags}}=0.0100$. La adición de NMN también podría mejorar el recuento de células en 92 h en blastocistos de animales jóvenes madurados en **(C)** medios definidos simples, que inducen estrés cultural (ANOVA unidireccional $F(4, 73) = 5.740$, $**p_{\text{ags}}=0.0057$, $n_{\text{orte}}=13-20$ por grupo). **D**, El tratamiento con el inhibidor de NAMPT FK866 a las concentraciones indicadas provoca embrión muerte en el día 6 (se muestra el porcentaje de blastocistos supervivientes, $n_{\text{orte}}=4$ experimentos independientes). Tratamiento con el inhibidor de NaPRT, el ácido 2-hidroxinicotínico, tiene un efecto mínimo sobre la formación de blastocistos (**mi**) o número de celular (**F**) en comparación con el tratamiento con FK866 (se muestran los datos del día 6, $n_{\text{orte}}=3-6$ por grupo). **gramo**. El tratamiento con los inhibidores de sirtuina splitomicina y sirtinol bloquea la formación de blastocistos (cada uno el punto de datos representa un experimento separado, $n_{\text{orte}}=2-4$). **h**, Co-tratamiento de sirtinol con el p53 El inhibidor pifithrin invierte el bloqueo inducido por sirtinol en la formación de blastocistos (ANOVA de 2 vías sirtinol $F(1, 12)=8,608$, pifitrina $F(2, 12)=7,539$, $**p_{\text{ags}}=0.0017$, $***p_{\text{ags}}=0.0003$, $n=3$ independiente experimentos). Datos analizados en **(a)** dentro de cada día por ANOVA unidireccional con Kruskal-Wallis comparación múltiple, **(C)** por ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Dunnett, **(h)** por ANOVA de 2 vías con prueba de comparación múltiple de Dunnett. **(C)**, **(gramo)** y **(h)** Datos de embriones mantenidos en medios simples definidos, fijados a las 92 horas después de la fertilización. Cada punto de datos en **a**, **B**, **D**, **F**, **gramo**, **h** representa proporciones de embriones de una corrida experimental separada. Los datos se presentan como gráficos de violín con valores de mediana y cuartil indicados por línea de puntos.

Figura complementaria S6

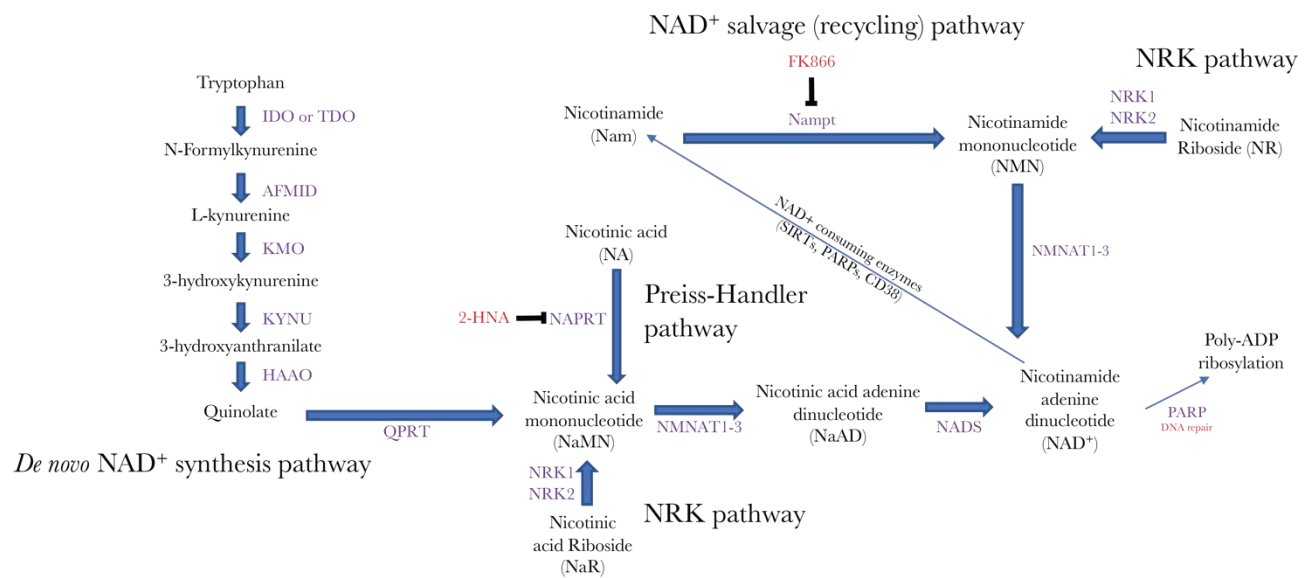
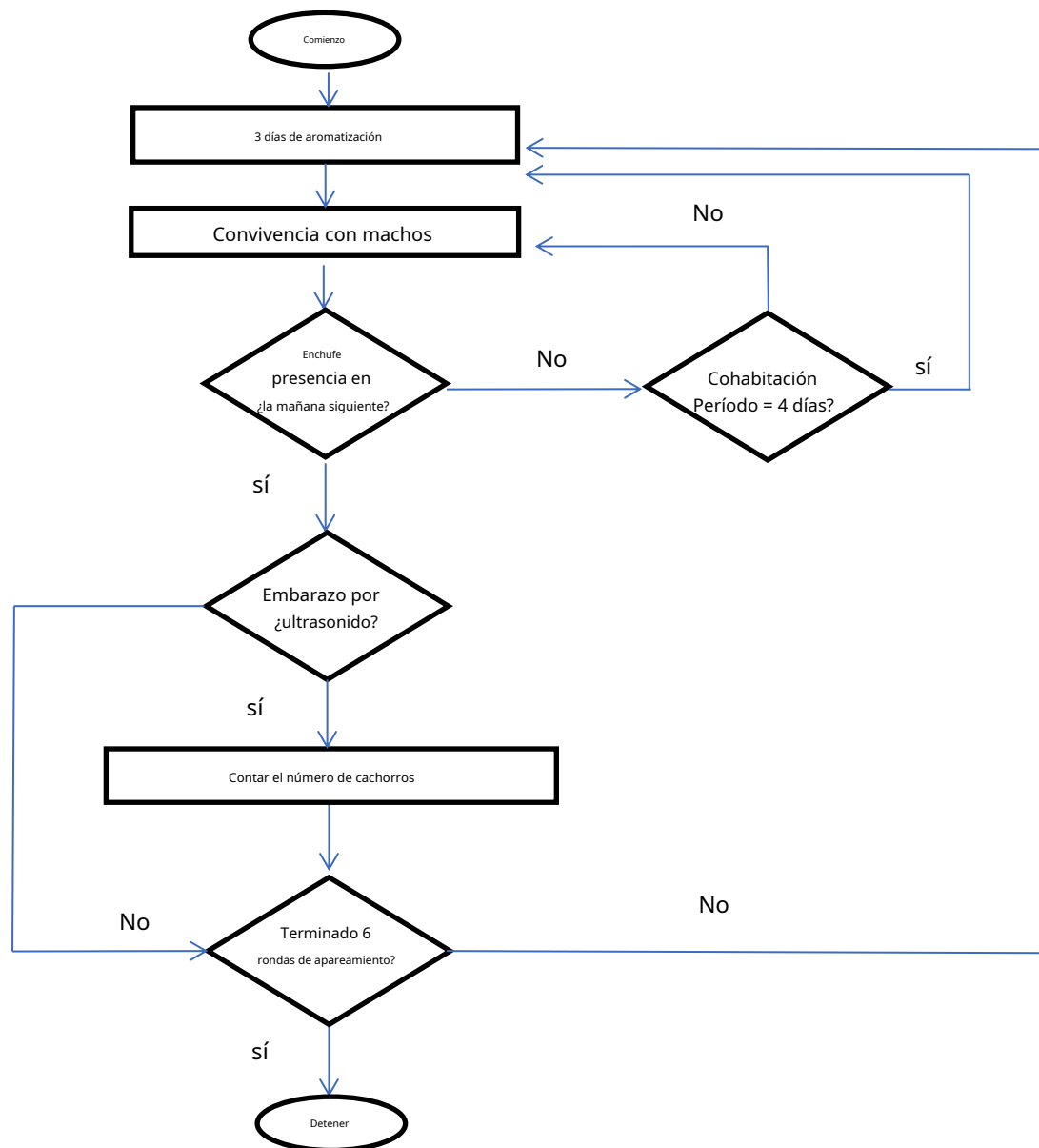


Figura complementaria S6. Relacionado con la Figura 4 y la Figura complementaria S5. Esquema para NAD⁺ rutas biosintéticas.

Métodos S1



Métodos S1. Relacionado con los métodos STAR y con la Figura 3h. Disposición experimental para prueba de apareamiento de animales SIRT2-Tg. Las hembras fueron perfumadas con ropa de cama sucia de los machos durante 3 días antes cohabitación con machos de capacidad reproductiva comprobada. A continuación, los ratones hembra se separaron de hombres si se observó un tapón vaginal dentro de los 4 días de cohabitación. De lo contrario, el máximo Se permitió un período de convivencia de 4 días, seguido de separación independientemente de la presencia de un enchufe El latido del corazón fetal, según lo determinado por imágenes de micro-ultrasonido, se usó luego como un indicador de embarazo después de 21 días de convivencia por ecografía. Los ratones no preñados fueron

luego volvió al proceso de crianza. Las rondas de apareamiento se terminaron después de 6 rondas.

completado, o a menos que los animales tuvieran que ser censurados del estudio debido a problemas de salud.