

Caveolinas cardíacas y modulación de la óxido nítrico sintetasa durante el estado hipovolémico según avanza la edad

Age-Related Changes of Cardiac Caveolins and Nitric Oxide Synthase Modulation during Hypovolemic State

NOELIA D. ARRECHE, LORENA I. SARATI, CARLA R. MARTÍNEZ, ANDREA L. FELLET, ANA M. BALASZCZUK

Recibido: 26/11/2010

Aceptado: 16/02/2011

Dirección para separatas:

Farm. Noelia D. Arreche
Cátedra de Fisiología, Facultad
de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires
Junín 956 - 7º Piso
(C1113AAD) CABA
Tel. 4964-8279 int. 312
Fax: 4964-8279 int. 309
e-mail: narreche@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Introducción

El óxido nítrico (NO) es uno de los factores que se estimulan durante el estado hipovolémico. Las caveolinas afectarían la producción de NO en el corazón según avanza la edad.

Objetivo

Investigar la interacción entre la caveolina-1 (cav-1) y la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) en ventrículos de ratas jóvenes y adultas sometidas a hemorragia aguda.

Material y métodos

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos jóvenes (2 meses de edad) y adultas (12 meses de edad). Se conformaron dos grupos experimentales de cada grupo etario (jóvenes y adultas): Control y Hemo (sangrado: 20% de la volemia). Los animales se sacrificaron para la extracción del ventrículo izquierdo.

Resultados

Luego del sangrado, la actividad de la NOS aumentó el 21% y el 45% en ratas jóvenes y el 32% y el 56% en adultas. El Western blot reveló que los niveles de eNOS fueron menores (31%) en ratas adultas. La hemorragia ocasionó un aumento del 147% de la eNOS a los 60 min en animales jóvenes y del 66% en adultos, atenuándose a los 120 min. La colocalización mostró un patrón difuso de localización de la eNOS asociado con cav-1 en animales del grupo Control jóvenes. En el grupo Hemo, a los 60 min se observó un patrón de disociación, el cual fue parcialmente restablecido a los 120 min. En los animales adultos del grupo Control se observó un patrón de localización de la eNOS y cav-1 con una disociación mayor que en las ratas jóvenes. Esta característica se observó también luego de los 60 y los 120 min.

Conclusión

El aumento de la producción de NO ante un estado hipovolémico se ve condicionado por la presencia de cav-1, la cual cumple un papel preponderante en el proceso del envejecimiento.

REV ARGENT CARDIOL 2011;79:487-492.

Palabras clave > Hemorragia - Óxido nítrico - Ventrículo izquierdo

Abreviaturas

cav-1	Caveolina-1	NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial	NOS	Óxido nítrico sintetasa
FC	Frecuencia cardíaca	PAM	Presión arterial media

INTRODUCCIÓN

La pérdida aguda de sangre induce un estado hipovolémico que se caracteriza por una anormalidad del sistema circulatorio que provoca una perfusión y una oxigenación tisulares inadecuadas. La adaptación del

sistema cardiovascular ante la pérdida aguda de volumen sanguíneo depende no sólo del control dinámico del sistema nervioso autónomo, sino también de la magnitud de la hemorragia, de la velocidad del sangrado y

de la especie examinada. (1) El sistema del NO es uno de los múltiples factores que se estimulan durante la depleción aguda de volumen y ha sido involucrado en la patogenia del shock hemorrágico. (2, 3) Tres isoformas de la enzima NO sintetasa (NOS) se expresan de manera compartimentalizada en el cardiomiocito, codificadas por genes separados. (4) En estudios previos hemos demostrado que el sistema del NO a partir de la NO sintetasa endotelial (eNOS) constituiría, en las etapas más tempranas del shock hemorrágico, un mecanismo de protección del sistema cardiovascular. (5) La eNOS se expresa en el endotelio vascular y endocárdico, así como en los cardiomiocitos, los monocitos y las plaquetas. (6, 7) La localización subcelular de la síntesis de NO tiene una influencia muy importante sobre la actividad biológica de la enzima. Numerosos trabajos muestran que la eNOS interactúa directamente con proteínas estructurales de las caveolas, o caveolinas (cav), que modulan numerosas vías de señalización, incluida la producción de NO. (8, 9)

Por otra parte, es conocido que el envejecimiento es un proceso multifactorial que tiene lugar durante la última etapa del ciclo vital. (10) El avance normal de la edad es acompañado por cambios a nivel bioquímico, histológico y morfológico en el sistema cardiovascular que alteran la capacidad de tolerar y responder a varias formas de estrés. (11) Una variedad de eventos, como las enfermedades o lesiones, la exposición a toxinas o niveles de actividad física, podrían influir en la actividad de las distintas isoformas de la NOS y la producción de NO durante el envejecimiento normal. (12) Experimentos *in vivo* demuestran una expresión mayor de cav-1 en tejidos de ratas adultas, como el cerebro, el corazón, el bazo y el hígado. Estos resultados sugieren que las caveolinas podrían desempeñar un papel importante en el proceso de envejecimiento. (13) Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue investigar la interacción entre la cav-1 y la eNOS en ventrículos de ratas jóvenes y adultas sometidas a una hemorragia aguda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos jóvenes (2 meses de edad) y adultas (12 meses de edad). Los animales se mantuvieron en un ambiente con humedad y temperatura controlada con un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas. Fueron alimentados con una dieta balanceada provista por Nutrimentos Purina, Buenos Aires, Argentina, y con agua *ad libitum* hasta el día de los experimentos. Todos los animales incluidos en los protocolos experimentales se trataron de acuerdo con los lineamientos y principios de la Disposición N° 6344-96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación.

Animales

Las ratas fueron anestesiadas con etiluretano (1,0 g/kg, i.p.). La temperatura corporal se monitorizó con un termómetro rectal y se mantuvo entre 36 y 38 °C durante todo el

tiempo experimental. La traqueotomía se practicó con un tubo de polietileno (PE-240) con el objetivo de mantener una ventilación pulmonar correcta. La medición de la presión arterial media (PAM) se realizó con una cánula inserta en la arteria femoral derecha conectada a un transductor de presión (Statham P23 ID, Gould Inst. Cleveland, OH) y se registró con un polígrafo (Physiograph E & M Co, Houston, TX). Los valores de la frecuencia cardíaca (FC) se obtuvieron partir de la señal de presión pulsátil latido a latido mediante un tacógrafo preamplificador (S77-26 tachometer, Coulbourn Inst., Allentown, PA). Para la adquisición de datos se utilizó el programa Labtech Notebook (Laboratory Tech., Wilmington, MD). Se realizó la monitorización continua de los valores de la PAM y de la FC para asegurar la homogeneidad de los parámetros hemodinámicos de todos los animales de los diferentes grupos experimentales. El estado hipovolémico se indujo mediante la extracción del 20% del volumen total de sangre a una tasa constante desde la arteria femoral durante 2 minutos (min). La extracción del volumen se estandarizó individualmente respecto del peso de las ratas a fin de producir un nivel constante de sangrado del 20% del volumen calculado de sangre total.

Protocolo experimental

Se utilizaron dos grupos experimentales de cada grupo etario (jóvenes y adultas):

1. Ratas control (Control). Luego de un período de estabilización de 30 min, se registraron los valores basales de la PAM y la FC durante 5 min. *A posteriori* se registraron la PAM y la FC durante 60 o 120 min (n = 14).

2. Ratas hipovolémicas (Hemo): luego de un período de estabilización de 30 min, se midieron los valores de la PAM y la FC durante 5 min y luego los animales fueron sometidos a una hemorragia aguda del 20% de la volemia. *A posteriori* se registraron en forma continua los valores de la PAM y la FC durante 60 o 120 min (n = 14).

Actividad de la NOS

Se determinó la actividad NADPH-diaforasa como actividad histoquímica total de la NOS (n = 5 por grupo). Los animales jóvenes y adultos de los grupos Control y Hemo fueron sacrificados por decapitación a los 60 min y a los 120 min luego de la hemorragia, respectivamente. Luego se extrajo el ventrículo izquierdo, que posteriormente se fijó en paraformaldehído al 4% (*buffer* fosfato 0,1 M, pH = 7,4). Los tejidos se criopreservaron en sacarosa al 15% y se congelaron. Se cortaron secciones de tejido de 15 µm en un crióstato Leitz, que luego se montaron en portaobjetos gelatinizados. A continuación, los cortes se incubaron con una solución con 1,2 mM de NADPH y 0,24 mM de azul de nitrotetrazolio (*buffer* fosfato con tritón X-100: 0,3%) durante 60 min a 37 °C. La observación de los cortes y la toma de fotografías se realizaron con un microscopio Zeiss Axiophot acoplado a una cámara fotográfica digital. El análisis de las imágenes obtenidas de los cortes de tejido y la determinación de su densidad óptica se efectuó con el *software* Scion Image.

Western blot

Los animales jóvenes y adultos de los grupos Control y Hemo (n = 5 por grupo) fueron sacrificados por decapitación, a los 60 min y a los 120 min luego de producida la hemorragia para la extracción de la aurícula derecha y del ventrículo izquierdo. Los tejidos se transfirieron de inmediato a un vaso de precipitado con *buffer* de homogeneización (50 mmol/L Tris, 0,1 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L EGTA, 1% tritón, 1 mmol/L

PMSF, 1 $\mu\text{mol/L}$ pepstatina, 2 $\mu\text{mol/L}$ leupeptina; Roche Diagnostics). La cuantificación de las proteínas se efectuó con el método de Lowry. Se separaron cantidades iguales de las muestras de proteínas (45 μg) en un gel 7,5% SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Munchen, Germany). Se prosiguió con una incubación primaria con anticuerpo policlonal de conejo anti la isoforma endotelial de la NOS (dilución 1:500). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa de rabanito (dilución 1:5000). Las muestras se revelaron por quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden) durante 2-4 min. La densidad de las bandas se determinó por densitometría con un escáner Hewlett-Packard y un *software* de análisis Totallab (Biodynamics Corp., Seattle, WA).

Inmunofluorescencia

Se llevó a cabo un análisis de coimmunoprecipitación para estudiar la interacción de la cav-1 con la eNOS en el ventrículo izquierdo ($n = 4$). Los tejidos de los animales jóvenes y adultos de los grupos Control y Hemo se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído en *buffer* fosfato (PBS) a 4 °C. Los ventrículos fueron posfijados durante toda la noche en la misma solución fijadora y se lavaron exhaustivamente. Luego, los tejidos se colocaron durante la noche en una solución al 30% de sacarosa en PBS y se congelaron a -80 °C. Posteriormente se obtuvieron secciones de 16 mm de espesor con un criostato Leitz y se recogieron sobre portaobjetos gelatinizados. Después del lavado con PBS, los cortes se incubaron en una solución de bloqueo (suero de normal de cabra al 10% en PBS) durante 60 min a temperatura ambiente. Estos cortes se incubaron con un anticuerpo monoclonal de conejo anti cav-1 (dilución 1:500) y anticuerpo policlonal de ratón anti eNOS (dilución 1:500) a 4 °C durante toda la noche. Después del realizar lavados en PBS, los cortes se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con sustancias fluorescentes, anticuerpo de cabra conjugado con fluoresceína anti IgG de ratón (dilución 1:50) y anticuerpo de cabra conjugado con rodamina anti IgG de conejo (dilución 1:50) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se volvieron a realizar lavados con PBS y los cortes se montaron en solución de PBS / glicerol (3,1 vol/vol) antes de la observación al microscopio de fluorescencia (Olympus BX 51). Se utilizaron cortes como controles negativos, los que fueron incubados sólo con el anticuerpo primario y no mostraron fluorescencia (datos no presentados). La colocalización de la cav-1 y la eNOS se visualizó mediante la superposición de las fotografías verdes (eNOS) sobre las fotografías rojas (cav-1) con el programa QCapture Pro 6.0 (QImaging Corporation, 2006), que dio por resultado una imagen en amarillo que representa el área de colocalización (Merge). El área de colocalización en las microfotografías Merge se indica con flechas blancas.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Para comparar los cambios en los parámetros hemodinámicos se empleó la prueba de la *t* de Student para datos apareados. Para el análisis del resto de los datos se utilizó el análisis de la varianza de una variable (ANOVA) seguido *a posteriori* de una prueba de Bonferroni para múltiples comparaciones. Se comprobaron los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia de los datos. Se consideró significativo el 5% de probabilidad. Para el análisis estadístico se utilizó el programa de estadística GraphPad Prism versión 3.02 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Parámetros hemodinámicos

En la Tabla 1 se detalla el curso temporal de la PAM y la FC durante el período experimental en todos los grupos de animales estudiados. En condiciones basales, estos parámetros hemodinámicos no mostraron diferencias significativas en los cuatro grupos. La hemorragia provocó en los animales jóvenes y adultos una disminución significativa de la PAM, la cual se estabilizó a los 15 min en valores cercanos a 50 ± 5 mm Hg (* $p < 0,01$ vs. valores basales). Esta hipotensión se mantuvo a lo largo de todo el período experimental. La hemorragia indujo, luego de la esperada respuesta refleja, una bradicardia durante 2 min después del sangrado, seguida de un incremento gradual de la FC hasta finalizar el período experimental en los dos grupos etarios estudiados.

Actividad de la NOS

No se observaron diferencias significativas en la actividad histoquímica de la NOS en los ventrículos pertenecientes al grupo Control de los animales adultos respecto de los animales jóvenes. Luego del sangrado observamos que, en las ratas jóvenes, la actividad de la NOS aumentó a los 60 y 120 min (21% y 45%, respectivamente) en relación con los animales controles. En los animales adultos, luego de transcurridos 60 y 120 min de inducida la hemorragia, el aumento de la actividad fue del 32% y del 56%, respectivamente (Figura 1).

Western blot

En la Figura 2 se grafica el análisis de Western blot con empleo del anticuerpo anti eNOS en el tejido ventricular izquierdo de todos los grupos de animales. El análisis reveló que en el grupo Control los niveles proteicos de eNOS fueron significativamente menores (31%) en ratas adultas en comparación con las ratas jóvenes. En los animales jóvenes, la hemorragia ocasionó un aumento en los niveles proteicos de eNOS a

Tabla 1. Curso temporal de la presión arterial media y de la frecuencia cardíaca

	Basal	PAM Hemo	120 min	Basal	FC 120 min
Grupo Control					
Jóvenes	84 \pm 3	–	–	325 \pm 8	326 \pm 12
Adultos	87 \pm 3	–	–	316 \pm 9	314 \pm 10
Grupo Hemo					
Jóvenes	90 \pm 4	27 \pm 2*	27 \pm 2*	321 \pm 9	382 \pm 6*
Adultos	93 \pm 5	24 \pm 3*	24 \pm 3*	315 \pm 6	391 \pm 9*

* $p < 0,01$ vs. valores basales. PAM: Presión arterial media. FC: Frecuencia cardíaca.

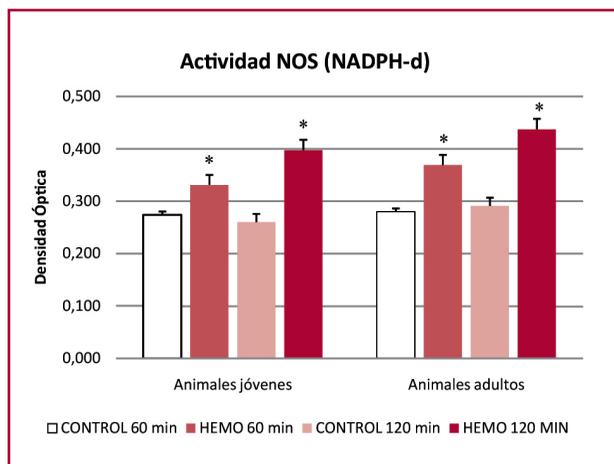


Fig. 1. Actividad NADPH diaforasa a los 60 y 120 min posteriores a una hemorragia del 20% de la volemia en el ventrículo izquierdo de ratas jóvenes y adultas. * $p < 0,001$ vs. grupo Control de igual grupo etario.

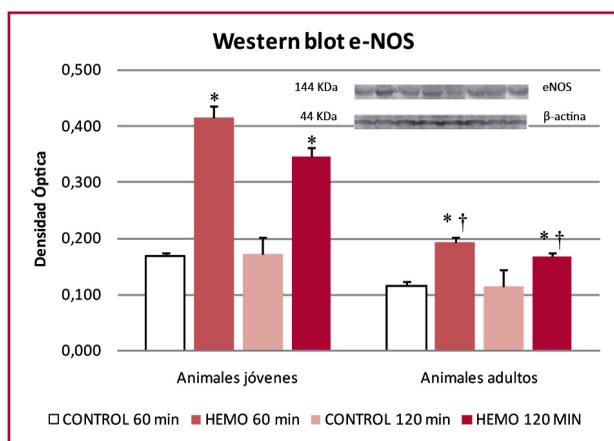


Fig. 2. Western blots representativos de la NOS endotelial a los 60 y 120 min posteriores a una hemorragia del 20% de la volemia en el ventrículo izquierdo de ratas jóvenes y adultas. * $p < 0,05$ vs. grupo Control de igual grupo etario. † $p < 0,05$ vs. animales jóvenes.

los 60 min (147%) en comparación con los animales controles, atenuándose este incremento a los 120 min del sangrado. En animales adultos, el aumento en la expresión de la eNOS fue del 66% a los 60 min atenuándose también este incremento a los 120 min.

Inmunofluorescencia

El estudio de colocalización mostró que en ratas jóvenes del grupo Control existe un patrón difuso de localización de eNOS en células ventriculares asociado con cav-1. A los 60 min de haber sido sometidos estos animales a una hemorragia aguda del 20% de la volemia se observa una disociación entre cav-1 y eNOS, la

cual se restablece parcialmente luego de transcurridos 120 min del sangrado (Figura 3 A). Los ventrículos de los animales adultos del grupo Control mostraron un patrón de localización de eNOS y cav-1 con una disociación mayor que los animales jóvenes del mismo grupo. Esta característica se observó también luego de los 60 y los 120 min de realizado el sangrado (Figura 3 B).

DISCUSIÓN

En respuesta al estado hipovolémico producido por hemorragia aguda se producen numerosos cambios fisiológicos. El aumento del tono simpático y la liberación de vasoconstrictores caracterizan la respuesta de adaptación a la hipovolemia; sin embargo, el papel potencial de sustancias vasodilatadoras en este estado no se ha esclarecido. (3) Los animales de los diferentes grupos presentaron condiciones hemodinámicas basales similares. Tanto en animales jóvenes como adultos, la pérdida del 20% de la volemia indujo un descenso rápido y significativo (68%) de la presión arterial. El estado hipotensivo se mantuvo durante todo el tiempo experimental. Al evaluar la respuesta cronotrópica, se ha encontrado que el estado hipovolémico indujo luego de la inmediata y esperada taquicardia refleja una breve bradicardia seguida por un incremento gradual y progresivo de la FC en los animales de ambos grupos etarios. En los últimos años se ha demostrado que el NO actuaría presinápticamente facilitando el tono vagal (14) y disminuyendo la FC luego de la taquicardia refleja en ratas sometidas a una hemorragia. Además, nuestros resultados muestran que la pérdida aguda del 20% de la volemia induce un incremento en la actividad de la NOS ventricular, tanto a los 60 min como a los 120 min de realizado el sangrado en ambos grupos etarios estudiados. Las principales características del envejecimiento del sistema cardiovascular reflejan cambios anatómicos y estructurales a nivel de la pared de los vasos, la relajación miocárdica, el llenado ventricular y la respuesta a las catecolaminas. (15) Además, existen evidencias que demuestran que el sistema del NO modularía los cambios funcionales que caracterizan el envejecimiento de este sistema. (16, 17) Nuestros resultados demuestran que el aumento de actividad de la NOS se correlacionó con aumentos en los niveles proteicos de la isoforma endotelial. Sin embargo, los niveles de eNOS en los ventrículos de ratas adultas fueron significativamente menores que en ratas jóvenes. Además, el incremento en los niveles de eNOS a los 60 y 120 min de realizada la hemorragia fueron de menor magnitud en los animales adultos respecto de los animales jóvenes. Por lo tanto, el estado hipovolémico luego de una pérdida aguda de sangre induce, en las etapas más tempranas y en las más tardías, una activación del sistema del NO ventricular. El origen y la magnitud de este cambio serían dependientes de la edad del individuo estudiado. En los últimos años se ha puesto de manifiesto el importante papel de la asociación física de las distintas isoformas de la NOS

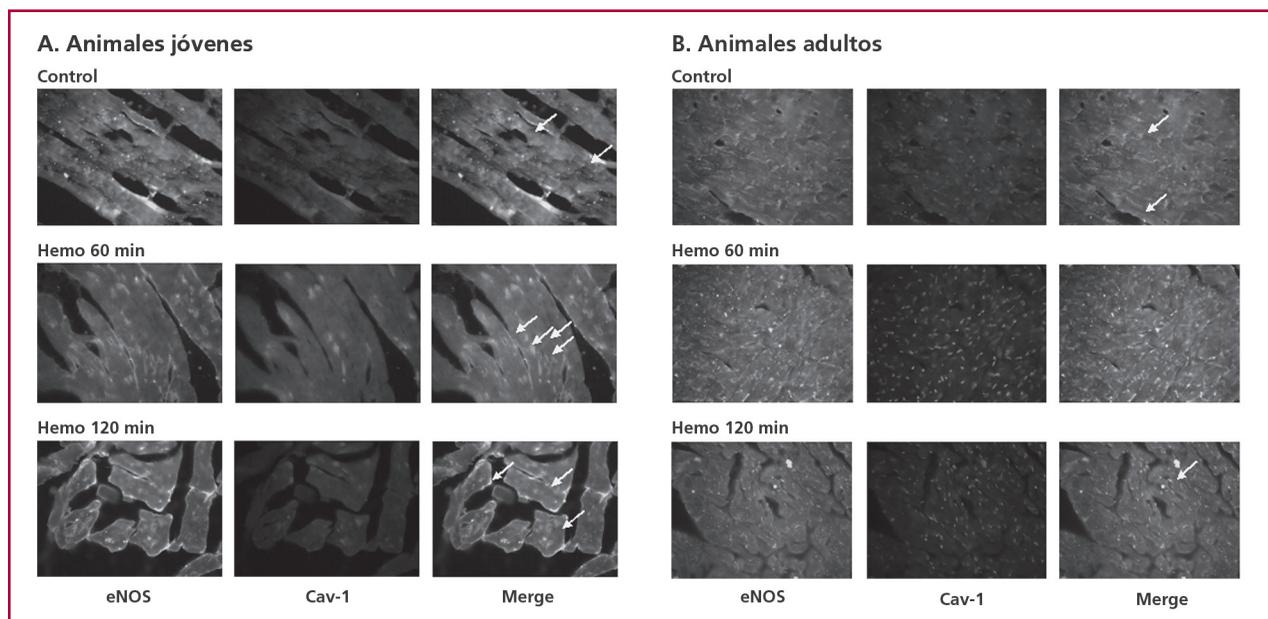


Fig. 3. A. Animales jóvenes. **B.** Animales adultos. Colocalización mediante inmunofluorescencia indirecta de eNOS y cav-1 a los 60 y 120 min posteriores a una hemorragia del 20% de la volemia en el ventrículo izquierdo de ratas jóvenes y adultas (40x). Las flechas indican las zonas de colocalización (Merge).

con una gran variedad de proteínas reguladoras y estructurales. (18) Diferentes grupos de investigación mostraron que la cav-1 interactúa directamente con la eNOS inhibiendo la activación de esta enzima tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro*. (19-21). En los últimos años se ha postulado a la cav-1 como un regulador importante de los procesos subyacentes al avance normal de la edad. Los resultados obtenidos por Cho y colaboradores (13) indican que un simple ajuste de los niveles de caveolinas en las células senescentes puede influir profundamente en el fenotipo que caracteriza al envejecimiento. En este trabajo demostramos que la cav-1 se asocia con la eNOS ventricular de manera heterogénea con dependencia del tiempo de inducida la hemorragia. Existe una disociación mayor de estas proteínas a los 60 min de inducido el sangrado que a los 120 min. Por lo tanto, luego de una hora de haberse desencadenado el estado hipovolémico, la mayor actividad de la NOS podría deberse al menor grado de inhibición de la cav-1 sobre la eNOS. Además, la edad sería un factor que contribuye en la regulación de la cav-1 sobre el sistema del NO, ya que se observa una disociación mayor entre estas proteínas en los animales adultos respecto de los animales jóvenes en ambos grupos estudiados (Control y Hemo).

CONCLUSIÓN

Con el avance de la edad, la cav-1 sería un modulador preponderante de la producción de NO ventricular ante un estado hipovolémico inducido por una pérdida aguda de sangre.

SUMMARY

Age-Related Changes of Cardiac Caveolins and Nitric Oxide Synthase Modulation during Hypovolemic State

Background

Nitric Oxide (NO) is one of the factors activated by hypovolemic state. Caveolins might affect the production of NO with increasing age.

Objective

To investigate the interaction between caveolin-1 (cav-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the ventricles of young and adult rats subjected to acute bleeding.

Material and Methods

We used young (2 months old) and adult (12 months old) male Sprague-Dawley rats. The animals from each age group (young and adult) were divided into two experimental groups: Control: control group, and Hem: bleeding group (20% of blood volume). The animals were sacrificed and the left ventricle was resected.

Results

After bleeding, NOS activity increased by 21% and 45% in young rats and by 32% and 56% in adult rats. Western blot analysis revealed that NOS levels were lower (31%) in adult rats. Sixty minutes after bleeding, eNOS activity increased by 147% in young animals and by 66% in adults, with lower increase at 120 minutes. Colocalization showed a diffuse pattern of eNOS location associated with cav-1 in group Control of young animals. A dissociation pattern was observed in group Hem at 60 min which was partially restored at 120 min. The dissociation pattern of eNOS and cav-1 in group Control adult animals was greater compared to that of young rats. This characteristic was also seen after 60 min and 120 min.

Conclusion

The increased production of NO during hypovolemic state depends on the presence of cav-1 which plays a key role in the aging process.

Key words > Bleeding - Nitric Oxide - Left Ventricle

BIBLIOGRAFÍA

1. Schadt JC, Ludbrook J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am J Physiol* 1991;260:H305-18.
2. Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med* (Maywood) 2006;231:343-65.
3. Atkins JL, Day BW, Handrigan MT, Zhang Z, Pamnani MB, Gorbunov NV. Brisk production of nitric oxide and associated formation of S-nitrosothiols in early hemorrhage. *J Appl Physiol* 2006;100:1267-77.
4. Seddon M, Shah AM, Casadei B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* 2007;75:315-26.
5. Balaszczuk AM, Arreche ND, Mc Laughlin M, Arranz C, Fellet AL. Nitric oxide synthases are involved in the modulation of cardiovascular adaptation in hemorrhaged rats. *Vascul Pharmacol* 2006;44:417-26.
6. Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, et al. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res* 2003;92:1322-9.
7. Schulz E, Anter E, Zou MH, Keaney JF Jr. Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation* 2005;111:3473-80.
8. Feron O, Balligand JL. Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc Res* 2006;69:788-97.
9. Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2006;24:75-84.
10. Franklin NC, Tate CA. Lifestyle and successful aging: An overview. *American Journal of Lifestyle Medicine* 2009;3:6-11.
11. Willems L, Ashton KJ, Headrick JP. Adenosine-mediated cardioprotection in the aging myocardium. *Cardiovasc Res* 2005;66:245-55.
12. Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann NY Acad Sci* 2002;959:66-81.
13. Cho KA, Ryu SJ, Park JS, Jang IS, Ahn JS, Kim KT, Park SC. Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* 2003;278:27789-95.
14. Fujisawa Y, Mori N, Yube K, Miyanaka H, Miyatake A, Abe Y. Role of nitric oxide in regulation of renal sympathetic nerve activity during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol* 1999;277:H8-14.
15. Lakatta EG. Cardiovascular aging in health. *Clin Geriatr Med* 2000;16:419-44.
16. Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, González-Fernández F, Millás I, Montón M, et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res* 1998;83:279-86.
17. Ziemann SJ, Gerstenblith G, Lakatta EG, Rosas GO, Vandegaer K, Ricker KM, Hare JM. Upregulation of the nitric oxide-cGMP pathway in aged myocardium: physiological response to L-arginine. *Circ Res* 2001;88:97-102.
18. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F178-90.
19. García-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:25437-40.
20. García-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6448-53.
21. Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997;272:18522-5.