



REVISIÓN

Disfunción endotelial asociada al envejecimiento vascular humano

Carlos F. Sánchez Ferrer^{a,*}, Concepción Peiró^a y Leocadio Rodríguez-Mañas^b

^a Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

^b Servicio de Geriátrica, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, España

Recibido el 10 de marzo de 2011; aceptado el 14 de abril de 2011

Disponible en Internet el 28 de mayo de 2011

PALABRAS CLAVE

Disfunción endotelial;
Envejecimiento
vascular humano;
Vasodilatador

KEYWORDS

Endothelial
dysfunction;
Vascular aging
human;
Vasodilator

Resumen Una manifestación temprana de las enfermedades cardiovasculares es la disfunción endotelial, asociada a un entorno oxidativo e inflamatorio. En este trabajo se propone que, incluso durante un envejecimiento sano, en ausencia de enfermedades cardiovasculares, la capacidad vasodilatadora de las arterias humanas se reduce, ya que se ponen en marcha procesos oxidativos e inflamatorios en la pared vascular que alteran sus funciones fisiológicas y aumentan su fragilidad frente a las agresiones externas.

© 2011 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

Endothelial dysfunction associated with human vascular aging

Abstract Endothelial dysfunction, associated with an oxidative and inflammatory environment, is an early finding in cardiovascular diseases. In this communication, we propose that even during healthy aging, in the absence of cardiovascular diseases, the vasodilator ability of human arteries is reduced due to the development of several oxidative and inflammatory processes in the vascular wall that alter its physiological functions and increase its susceptibility to external injuries.

© 2011 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

La incidencia y prevalencia de enfermedades cardiovasculares se incrementa con la edad, hasta el extremo de que se ha identificado como un factor de riesgo dominante en este tipo de patologías^{1,2}. Aunque la disfunción endotelial

es un suceso clave en el desarrollo de estas enfermedades, nuestro conocimiento de los mecanismos subyacentes se limita en gran medida a los modelos animales^{1,3,4}. De hecho, se ha considerado casi imposible determinar estos mecanismos en humanos, ya que se requiere la obtención de vasos aislados de un gran número de sujetos⁴. Actualmente se acepta que el endotelio vascular es una delgada capa de células que tapiza la cara interior de las arterias y tiene un papel fundamental en la regulación de la circulación sanguínea. Entre otras cosas, es capaz de secretar sustancias, como el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina, que actúan sobre la pared vascular

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carlosf.sanchezferrer@uam.es
(C.F. Sánchez Ferrer).

subyacente y producen vasodilatación, manteniendo los vasos en buen estado y con una adecuada presión arterial.

Deterioro de la función endotelial asociada al envejecimiento

En modelos animales hay evidencia demostrada de la presencia de disfunción endotelial asociada al envejecimiento³⁻⁸. En humanos, también se ha descrito una disfunción endotelial relacionada con la edad en estudios *in vivo*⁹⁻¹³, aunque los posibles mecanismos implicados han sido escasamente investigados hasta ahora. Recientemente, nuestro grupo ha analizado la capacidad vasodilatadora dependiente del endotelio vascular en sujetos de entre 18 y 91 años sin enfermedad cardiovascular conocida ni factores de riesgo asociados (tabaquismo, diabetes, obesidad, hipercolesterolemia, etc.). El estudio se ha realizado tanto *in vivo* en sujetos conscientes (mediante una técnica denominada pletismografía del antebrazo) como *in vitro* (obteniendo microvasos mesentéricos humanos de pacientes sometidos a cirugía abdominal). En los microvasos aislados, además, se analizaron los factores pro-oxidantes y pro-inflamatorios implicados¹⁴.

Confirmando datos anteriores, en este trabajo se ha demostrado una disminución asociada al envejecimiento de las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio vascular. Así, la combinación de las dos aproximaciones experimentales utilizadas (*in vivo* e *in vitro*) en una importante muestra de sujetos con un amplio rango de edad y carentes de enfermedad cardiovascular conocida o factores de riesgo clásicos, demostró la existencia de un deterioro específico de la función endotelial dependiente de la edad, de acuerdo a lo previamente publicado en pacientes *in vivo*⁹⁻¹³. Una aportación interesante y novedosa fue que la disfunción endotelial observada fue muy parecida con ambas aproximaciones experimentales, *in vivo* e *in vitro*, aunque la relajación endotelio-dependiente en vasos aislados se indujo con bradicinina (BK), mientras que la observada en los estudios de pletismografía se provocó con acetilcolina (ACh). Esto tiene considerable relevancia, ya que nos permite postular que los mecanismos hallados en los estudios *in vitro* son aplicables previsiblemente a los datos *in vivo*.

Por otro lado, cabe destacar que, en nuestra aproximación *in vitro* con BK, los vasos se pre-contrajeron con un estímulo despolarizante (35 mmol/l de cloruro potásico [KCl]), lo que eliminaba la participación del factor endotelial hiperpolarizante en la relajación inducida por BK, descrita por algunos autores¹⁵. Aun así, la respuesta vasodilatadora y su deterioro con la edad observado *in vitro* con BK fueron análogos a los obtenidos con ACh *in vivo*, lo que sugiere que el papel del factor hiperpolarizante en estos vasos es probablemente limitado. En este sentido, y confirmando datos anteriores de nuestro laboratorio¹⁶, se observó que el componente fundamental de la relajación inducida por BK *in vitro* era el NO que, en el caso de sujetos menores de 60 años, estaba acompañado de un pequeño componente vasodilatador sensible al bloqueo por indometacina, lo que sugería un papel vasodilatador secundario para un derivado de la ciclooxigenasa¹⁴.

Por el contrario, las respuestas en vasos de sujetos mayores de 60 años fueron claramente distintas. De manera interesante, la vía del NO parecía bien conservada en estos vasos, de modo que el único factor vasodilatador producido por el endotelio en vasos envejecidos era el NO. Por tanto, la disfunción endotelial no es necesariamente debida a una reducción en la síntesis de NO, como sugieren otros autores¹⁷. Por otro lado, tras bloquear la síntesis de NO se abolió toda respuesta vasodilatadora a BK, apareciendo en su lugar una respuesta vasoconstrictora mediada por el endotelio y dependiente de la ciclooxigenasa (COX). En base a estos resultados, hemos postulado que el endotelio vascular envejecido es todavía capaz de producir suficiente NO para alcanzar una completa relajación del músculo liso vascular subyacente. Sin embargo, este NO es contrarrestado por un compuesto vasoconstrictor derivado del endotelio y producido por COX, así como por especies reactivas de oxígeno, preferentemente aniones superóxido (O_2^-), también producidos por las células endoteliales¹⁴.

Mecanismos inflamatorios implicados en la disfunción endotelial asociada al envejecimiento humano

Papel de la COX

La existencia de un factor vasoconstrictor endotelial asociado a la edad se ha propuesto con anterioridad en base a evidencias indirectas^{13,18}, pero nuestro laboratorio ha sido el primero en demostrarlo directamente en vasos humanos¹⁴. La naturaleza de este factor no se ha dilucidado todavía, pero desaparece en presencia de bloqueantes para los receptores de tromboxano/prostaglandina H_2 . Tampoco es descartable un papel para los O_2^- , ya que esas especies reactivas de oxígeno se han descrito como mediadores de la vasoconstricción endotelial dependiente de la COX¹⁸.

No existe consenso sobre la isoforma de la COX implicada en la producción de factores vasoconstrictores endoteliales⁸. Tampoco nosotros hemos podido esclarecer este punto, ya que no se observaron diferencias en los niveles de ARN mensajero (ARNm) para las dos isoformas conocidas de la enzima COX-1 y COX-2¹⁴. Sin embargo, existen mecanismos post-transcripcionales que pueden modular la actividad de esta enzima. En este sentido, se ha descrito que la actividad de COX puede estar regulada por distintos compuestos, como NO y peroxinitrito ($ONOO^-$)¹⁹. Además, se conoce una interacción fisiológica entre COX-2 e iNOS (la isoforma inducible de la NO sintasa), que lleva al NO o al $ONOO^-$ a activar la COX-2, en una interacción molecular sinérgica que interconecta dos enzimas inflamatorias como son COX-2 e iNOS²⁰.

Papel del estrés oxidativo y nitrosativo

Es conocido el papel del estrés oxidativo en la disfunción endotelial asociada a la edad^{10,12}. Recientemente, Donato et al²¹ han encontrado una relación entre marcadores de oxidación en células endoteliales y vasodilatación. Se acepta que el estrés oxidativo, principalmente los O_2^- , reducen la disponibilidad de NO e inhiben su diana princi-

Mecanismos de la disfunción endotelial dependiente de la edad en humanos

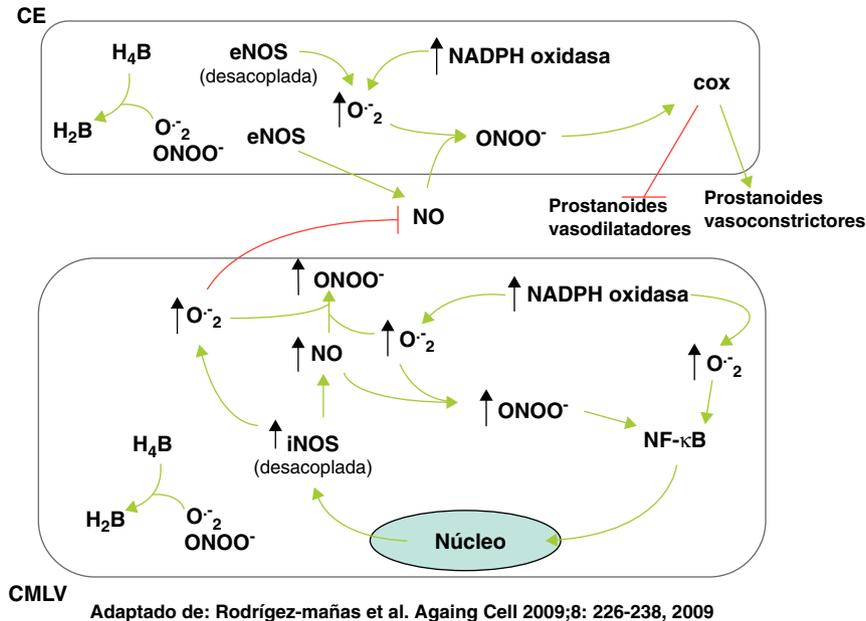


Figura 1 En las células endoteliales (CE), los aniones superóxido (O_2^-), generados por la NADPH oxidasa o el desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), producen peroxinitrito ($ONOO^-$) al combinarse con el óxido nítrico (NO). El $ONOO^-$ generado puede modular la actividad de la ciclooxigenasa (COX) endotelial favoreciendo la síntesis de prostanooides vasoconstrictores en detrimento de los prostanooides vasodilatadores. En la célula de músculo liso vascular (CMLV) se produce O_2^- como resultado de la actividad NADPH oxidasa o del desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). De nuevo, la combinación de O_2^- con NO produce $ONOO^-$, capaz de activar al factor de transcripción nuclear κB (NF- κB), que juega un papel esencial en los fenómenos de inflamación celular.

pal, la guanilato ciclasa soluble. Nuestro grupo ha podido visualizar la presencia de niveles aumentados de O_2^- en microvasos mesentéricos humanos procedentes de sujetos mayores de 60 años, mediante la sonda fluorescente dihidroetidio. Además, el papel funcional de los O_2^- se ha comprobado mediante compuestos barredores de los mismos, como tempol o superóxido dismutasa, capaces de mejorar la disfunción endotelial asociada a la edad¹⁴.

La generación de $ONOO^-$ emerge cada vez más como un mecanismo determinante en la producción de daño oxidativo en la pared vascular^{22,23}. También se han encontrado marcadores biológicos de este compuesto en microvasos mesentéricos de sujetos mayores de 60 años, como el incremento de los residuos de nitrotirosina¹⁴, lo que indica una mayor producción de $ONOO^-$ vascular, análogo al descrito previamente en ratas^{22,23}. El papel funcional del $ONOO^-$ como mediador de la disfunción endotelial asociada a la edad se ha confirmado con un agente barredor de $ONOO^-$ (ácido úrico), que mejora la relajación inducida por BK tanto como el antioxidante tempol¹⁴.

La formación de $ONOO^-$ requiere la interacción química de O_2^- y NO con una estequiometría de uno a uno^{24,25}. La producción de $ONOO^-$ depende de la concentración disponible de NO, que a su vez está en relación con la actividad de la sintasa de NO (NOS). Aunque la cantidad de tejido disponible sea muy pequeña, es posible investigar la expresión de ARNm para las isoformas constitutiva e inducible de la sintasa de NO (eNOS e iNOS, respectivamente) en la pared vascular de microvasos mesentéricos procedentes de sujetos menores y mayores de 60 años. Datos previos en rata

sugieren un aumento de la iNOS vascular dependiente de la edad^{23,26}, mientras que los datos sobre la expresión de eNOS son controvertidos^{4,22,27}. En nuestro laboratorio se ha observado que la expresión de ARNm para eNOS no se modifica con la edad, mientras que la isoforma iNOS se incrementa significativamente en la pared vascular de los sujetos mayores de 60 años¹⁴. La mejoría de la disfunción endotelial asociada a la edad producida por un inhibidor específico de la iNOS (1.400 W) sugiere además de forma clara que la iNOS es la fuente principal de NO para formar $ONOO^-$ en la pared de los vasos envejecidos. Aunque existe algún dato previo en cultivos de mesotelio humano²⁷, ésta ha sido la primera demostración en la pared vascular humana de la implicación de la isoforma inflamatoria iNOS en la disfunción endotelial asociada a la edad¹⁴.

Respecto del origen de los O_2^- detectados en la pared vascular, se ha obtenido evidencia de la posible participación del complejo enzimático NADPH oxidasa. Así, el ARNm de la isoforma nox-4 de la NADPH oxidasa, cuya expresión ha sido demostrada en la pared vascular humana²⁸, está incrementado en microvasos mesentéricos de sujetos mayores de 60 años, mientras que el inhibidor de esta enzima apocinina mejora la disfunción endotelial asociada a la edad¹⁴. Por el contrario, no hay evidencia alguna que apoye el papel de la enzima xantinoxidasa como fuente de O_2^- , lo que sugiere que la fuente principal de estrés oxidativo en el envejecimiento vascular no patológico es la NADPH oxidasa, de acuerdo a lo indicado por otros autores^{21,29}.

Otra posible fuente de O_2^- en el envejecimiento vascular puede ser el desacoplamiento de la NOS^{4,25,30}. Se sabe

que el ONOO⁻ desacopla la isoforma endotelial de la NOS³¹, que también puede producirse por una disminución de la biodisponibilidad del cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄), como consecuencia de su oxidación a BH₂ por O⁻₂ o ONOO⁻^{32,33}. Así, algunos datos en humanos indican que la administración del cofactor de NOS BH₄ mejora claramente la disfunción endotelial asociada a la edad medida por técnicas pletismográficas *in vivo*³⁴. En nuestro modelo de microvasos mesentéricos humanos aislados se ha observado un efecto similar, ya que la administración de BH₄ mejora la disfunción endotelial asociada a la edad de manera similar a la observada en presencia de agentes barredores de O⁻₂¹⁴. Aunque muchos trabajos mencionan la eNOS como la principal isoforma de NOS desacoplada capaz de producir O⁻₂⁴, la isoforma inflamatoria inducible iNOS es mucho más activa catalíticamente, consumiendo cantidades mayores de sustrato y cofactores, por lo que puede constituir una importante fuente de O⁻₂ en situaciones de carencia de sustrato o de BH₄³⁵.

Inflamación vascular y disfunción endotelial asociada a la edad

Hay cada vez más evidencia obtenida en modelos experimentales de que el envejecimiento vascular está asociado a procesos de inflamación vascular^{36–38}. En humanos, existen datos epidemiológicos que sugieren una asociación entre citocinas inflamatorias circulantes y mortalidad en sujetos ancianos^{39,40}. Más recientemente, Wang et al⁴¹ han descrito un perfil pro-inflamatorio en la pared aórtica de sujetos sin engrosamiento patológico. Por su parte, Donato et al²¹ han observado en células endoteliales una regulación al alza del factor de transcripción nuclear κB (NF-κB), fuertemente implicado en los fenómenos inflamatorios, que parece asociarse con la disfunción endotelial. Nuestro laboratorio ha descrito asimismo un aumento de la expresión y actividad de NF-κB con la edad en células mesoteliales peritoneales humanas en cultivo, en ausencia de estímulos inflamatorios²⁷. En microvasos mesentéricos humanos, hemos utilizado técnicas histoquímicas de Southwestern⁴² para demostrar de modo directo *in situ* la activación de NF-κB en función de la edad¹⁴. Además, hemos encontrado una correlación significativa entre la edad y el número de células vasculares con activación nuclear de NF-κB, lo que sugiere claramente un entorno inflamatorio en la pared vascular de los sujetos envejecidos. También se ha encontrado una clara correlación entre la presencia de disfunción endotelial asociada a la edad y la activación de NF-κB *in situ*. Hasta lo que sabemos, ésta es la primera demostración en la pared vascular humana de una relación entre la disfunción endotelial dependiente de la edad y el desarrollo de un entorno pro-inflamatorio en la pared vascular¹⁴.

Conclusiones

En base a los datos expuestos, nuestro grupo propone que la disfunción endotelial asociada a la edad es un proceso complejo que implica mediadores pro-oxidantes y pro-inflamatorios. Desgraciadamente, un estudio de esta naturaleza no permite establecer relaciones de causalidad entre estos mediadores o mostrar cuál de ellos precede

al otro. Tampoco se puede descartar la existencia de relaciones bidireccionales entre factores pro-oxidantes y pro-inflamatorios (fig. 1). Por una parte, se ha propuesto que un entorno pro-inflamatorio puede ser una típica característica del envejecimiento vascular humano en ausencia de riesgo cardiovascular añadido⁴³. En este sentido, el aumento del estrés oxidativo y de la inflamación en la pared vascular, junto con la disfunción endotelial, podría ser consecuencia de la senescencia de las células vasculares, con alteraciones indistinguibles de las observadas en fases tempranas de la aterosclerosis. No obstante, también puede ocurrir lo contrario, es decir, que el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial sean la causa, antes que la consecuencia, de la senescencia celular vascular y de la aterosclerosis⁴⁴. Es importante recordar que todos nuestros datos se han obtenido en vasos de sujetos mayores, pero que en ningún caso tenían evidencia clínica de enfermedad cardiovascular. Eso indica que, incluso durante un envejecimiento sano desde el punto de vista cardiovascular, se genera un ambiente oxidante y pro-inflamatorio que incrementa la fragilidad vascular y facilita el desarrollo de la enfermedad vascular clínica frente a factores de riesgo cardiovascular.

Bibliografía

1. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprise: Part I: aging arteries: a 'set up' for vascular disease. *Circulation*. 2003;107:139–46.
2. Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Love-lock CE, et al. Oxford Vascular Study. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet*. 2005;366:1773–8.
3. Matz RL, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction. Potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging*. 2003;20:527–50.
4. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res*. 2005;66:286–94.
5. Hongo K, Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, Lehman M, Vollmer DG, et al. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke*. 1988;19:892–7.
6. Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*. 1989;14:542–8.
7. Küng CF, Lüscher TF. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension*. 1995;25:194–200.
8. Matz RL, de Sotomayor MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol*. 2000;131:303–11.
9. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:471–6.
10. Eskurza I, Monahan KD, Robinson JA, Seals DR. Effect of acute and chronic ascorbic acid on flow-mediated dilatation with sedentary and physically active human ageing. *J Physiol*. 1994;556:315–24.

11. Gerhard M, Roddy MA, Creager SJ, Creager MA. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*. 1996;27:849–53.
12. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Fasolo CB, Sudano I, et al. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension*. 1997;29:736–43.
13. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Versar D, Salvetti C, Salvetti A. Endothelium, aging, and hypertension. *Curr Hypertens Reports*. 2006;8:84–9.
14. Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, López-Dóriga P, Solís J, Petidier R, et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*. 2009;8:226–38.
15. Félétou M, Vanhoutte P. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1215–25.
16. Vallejo S, Angulo J, Peiró C, Nevado J, Sánchez-Ferrer A, Petidier R, et al. Highly glycosylated oxyhaemoglobin impairs nitric oxide relaxations in human mesenteric microvessels. *Diabetologia*. 2000;43:83–90.
17. Lavi S, Yang EH, Prasad A, Mathew V, Barsness GW, Rihal CS, et al. The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans. *Hypertension*. 2008;51:127–33.
18. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2005;144:449–58.
19. Upmacis RK, Deeb RS, Hajjar DP. Oxidative alterations of cyclooxygenase during atherogenesis. *Prostaglandin Other Lipid Mediat*. 2006;80:1–14.
20. Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science*. 2005;310:1966–70.
21. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. 2007;100:1659–66.
22. Van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192:1731–44.
23. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, et al. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res*. 2002;90:1159–66.
24. Vinten-Johansen J. Physiological effects of peroxynitrite. Potential products of the environment. *Circ Res*. 2000;87:170–2.
25. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840–4.
26. Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Duran 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.
27. Nevado J, Vallejo S, El-Assar M, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Changes in the human peritoneal mesothelial cells during aging. *Kidney Int*. 2006;69:313–22.
28. Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1429–35.
29. Eskurza I, Kahn ZD, Seals DR. Xanthine oxidase does not contribute to impaired peripheral conduit artery endothelium-dependent dilatation with ageing. *J Physiol*. 2006;571:661–8.
30. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105:1656–62.
31. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002;109:817–26.
32. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:681–4.
33. Schiffrin EL. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: a matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation. *Hypertension*. 2008;51:31–2.
34. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Hara K, et al. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. *Atherosclerosis*. 2006;186:390–5.
35. Loscalzo J. What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation*. 2000;101:2126–9.
36. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech*. 2002;59:264–72.
37. Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G. Vascular inflammation in aging. *Herz*. 2004;29:733–40.
38. D'Alessio P. Aging and the endothelium. *Exp Gerontol*. 2004;39:165–71.
39. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger Jr WH, et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med*. 1999;106:506–12.
40. Volpato S, Guralnik JM, Ferrucci L, Balfour J, Chaves P, Fried LP, et al. Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study. *Circulation*. 2001;103:947–53.
41. Wang M, Zhang J, Jiang LQ, Spinetti G, Pintus G, Monticone R, et al. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension*. 2007;50:219–27.
42. Hernández-Presa MA, Gómez-Guerrero C, Egidio J. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int*. 1999;55:209–14.
43. Minamuro T, Komuro I. Vascular cell senescence. Contribution to atherosclerosis. *Circ Res*. 2007;100:15–26.
44. Erusalimsky J, Kurz DJ. Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol*. 2005;40:634–42.