



Sociedad
Española de
Arteriosclerosis



REVISIÓN

Potencial rol protector del óxido nítrico y Hsp70 asociado a alimentos funcionales en la aterosclerosis



Alejandra B. Camargo ^{a,b} y Walter Manucha ^{c,d,*}

^a IBAM, UNCuyo, CONICET, Facultad de Ciencias Agrarias, Chacras de Coria, Mendoza, Argentina

^b Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

^c Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo, Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (IMBECU-CONICET), Mendoza, Argentina

^d Área de Farmacología, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

Recibido el 3 de mayo de 2016; aceptado el 24 de mayo de 2016

Disponible en Internet el 2 de julio de 2016

PALABRAS CLAVE

Aterosclerosis;
Óxido nítrico/Hsp70;
Alimentos funcionales

Resumen En la actualidad se encuentran en constante revisión los mecanismos determinantes primarios y las posibles terapéuticas de una de las principales entidades patológicas considerada epidémica y constituida como problema de salud pública mundial: la aterosclerosis. En tal sentido, pacientes que la padecen presentan como común denominador disfunción mitocondrial, estrés oxidativo e inflamación. De especial interés, el óxido nítrico, un conocido gas mensajero vasoactivo, ha sido estrechamente relacionado con el proceso inflamatorio, oxidativo y disfuncional mitocondrial propio de la aterosclerosis. Por otro lado, muy recientemente se ha demostrado que alteraciones en la biodisponibilidad del óxido nítrico inducirían la expresión de proteínas de shock térmico. Este mecanismo sería inducido también por el uso de los denominados alimentos funcionales como estrategia para prevenir el envejecimiento vascular así como el desarrollo de aterosclerosis. Finalmente, el mayor conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la aterosclerosis nos permitirá proponer nuevas y posibles intervenciones higiénicas, sanitarias y terapéuticas.

© 2016 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Atherosclerosis;
Nitric oxide/Hsp70;
Functional food

Potential protective role of nitric oxide and Hsp70 linked to functional foods in the atherosclerosis

Abstract Atherosclerosis, one of the main pathologic entities considered epidemic and a worldwide public health problem, is currently under constant review as regards its basic determining mechanisms and therapeutic possibilities. In this regard, all patients afflicted with the

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: wmanucha@fcm.uncu.edu.ar (W. Manucha).

disease exhibit mitochondrial dysfunction, oxidative stress and inflammation. Interestingly, nitric oxide — a known vasoactive messenger gas — has been closely related to the inflammatory, oxidative and mitochondrial dysfunctional process that characterizes atherosclerosis. In addition, it has recently been demonstrated that alterations in the bioavailability of nitric oxide would induce the expression of heat shock proteins. This agrees with the use of functional foods as a strategy to prevent both vascular aging and the development of atherosclerosis. Finally, a greater knowledge regarding the mechanisms implied in the development of atherosclerosis will enable proposing new and possible hygiene, health and therapeutic interventions.

© 2016 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La aterosclerosis como entidad patológica emergente en los países industrializados responde a un síndrome caracterizado por el depósito y la infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre. Además, provoca inflamación, multiplicación y migración de las células musculares lisas condicionando el estrechamiento de la luz arterial¹, para finalmente conducir a la aparición de enfermedades cardiovasculares (ECV). En el proceso inflamatorio crónico propio de la aterosclerosis el daño tisular y la reparación pueden ocurrir en simultáneo y el depósito de tejido conjuntivo produce una fibrosis con anormal cantidad de tejido conjuntivo (fig. 1).

De especial interés, la Organización Mundial de la Salud se refirió a las ECV como una epidemia mundial desatendida, y destacó que se encuentran presentes en todos los países, con excepción de algunos muy pobres, y alertó además que representan una amenaza seria a nivel de salud pública, con gran impacto sobre el desarrollo social y económico. Los factores de riesgo que la agravan sirven como indicadores del estado de salud poblacional, y 5 de ellos guardan estrecha relación con enfermedades no transmisibles, como son la hipertensión arterial, el tabaquismo, el consumo de alcohol, la hipercolesterolemia, la obesidad o el sobrepeso². Estos factores de riesgo promueven el desarrollo del proceso inflamatorio propio de la aterosclerosis³⁻⁶.

El impacto sobre la salud pública y las proyecciones de la aterosclerosis a nivel mundial justifican que permanentemente se profundicen los estudios tendientes a comprender mejor los mecanismos determinantes primarios así como también sus terapéuticas. En tal sentido, pacientes que padecen aterosclerosis presentan como común denominador disfunción mitocondrial, estrés oxidativo e inflamación^{7,8}. El estrés oxidativo asociado a una menor biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) parece desempeñar un papel clave en la patogénesis de la aterosclerosis, la inflamación vascular y la disfunción endotelial⁹. En concordancia y de especial interés para la presente revisión, el NO, un conocido gas mensajero vasoactivo, ha sido muy recientemente relacionado con el proceso inflamatorio, oxidativo y disfuncional mitocondrial propio de la aterosclerosis¹⁰.

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo demostró, en acuerdo con otros laboratorios, que el aumento en la biodisponibilidad del NO induce la expresión de proteínas de shock térmico (HSP)¹¹⁻¹⁶. Las HSP son una familia altamente

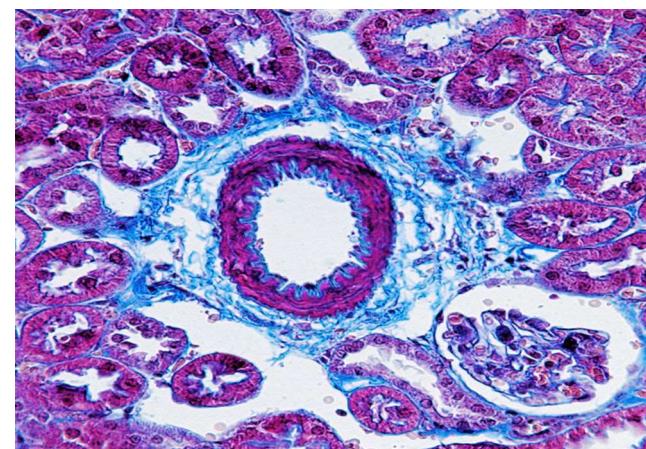


Figura 1 Tinción de fibras de colágeno por técnica de Masson. Imagen representativa: vaso procedente de corteza renal del ratón deficiente en apolipoproteína E como modelo de aterosclerosis. El depósito de matriz extracelular fibrilar en el tejido conjuntivo se aprecia en color azul. Se observa fibrosis con depósito incrementado de matriz extracelular. Magnificación 400×.

conservada de proteínas con diversas funciones expresadas por todas las células expuestas a estrés ambiental. Los estudios más recientes dan cuenta que ciertas HSP pueden ser potenciales marcadoras de riesgo de aterosclerosis y ECV relacionadas¹⁷, en tanto que otras, como la proteína de shock térmico 70 (Hsp70), parecen estar directamente relacionadas con efectos protectores sobre el desarrollo y el mantenimiento de la aterosclerosis¹⁸. La inducción de estas proteínas sería también modulada positivamente por el uso de los denominados alimentos funcionales como estrategia para prevenir el envejecimiento vascular así como el desarrollo de aterosclerosis¹⁹. Lo cual resulta coherente desde que se conoce que la dieta occidental se asocia con el proceso inflamatorio crónico involucrado en todas las etapas de desarrollo de la aterosclerosis, y que también se reconoce cada vez más como un mecanismo universal de desarrollo de diversas enfermedades degenerativas crónicas, tales como las autoinmunes, algunas neoplasias e inclusive la osteoporosis²⁰.

El concepto de alimentos funcionales se introdujo originalmente en oriente, hace más de 3 décadas, por autoridades sanitarias para garantizar una mejor calidad

de vida frente al incremento de la longevidad. Se propuso así una nueva concepción de alimentos desarrollados específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades²¹. Entre ellos destacan los que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimentaria, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos²². En consecuencia, los productos naturales están ganando mayor popularidad para combatir diversas amenazas que incluyen el estrés oxidativo, patologías cardiovasculares, el cáncer y hasta la disfunción inmune, entre las más destacadas. Específicamente y en relación a ECV, el uso de los alimentos funcionales y/o nutracéuticos representan nuevos aportes al conocimiento, a la prevención y al posible tratamiento. En este sentido, el ajo tiene una posición privilegiada en la historia y fue reconocido por su potencial terapéutico²³. Además, en los últimos tiempos se ha demostrado que la alicina (compuesto biológicamente activo del ajo) ejerce protección asociada a reducción del estrés oxidativo, modulación del NO e incremento significativo de Hsp70²⁴. Esto es relevante desde que se sabe que la disfunción de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) es causa primaria de la aterosclerosis y que ciertas HSP inhiben la proliferación de células musculares lisas y participarían de la reparación vascular²⁵.

La etiología de las principales ECV, tales como la aterosclerosis, permanecen aún sin estar completamente dilucidadas. Sin embargo, recientes evidencias sugieren que el NO y las HSP como Hsp70 resultan elementos clave en el proceso de estrés oxidativo que subyace a estas enfermedades. Por otra parte, de particular interés para los conocimientos actuales, ha sido recientemente sugerido un papel emergente de las vías de NO y de Hsp70 vinculadas al uso de alimentos funcionales. Por lo tanto, una mayor comprensión de los mecanismos implicados en el desarrollo de la aterosclerosis nos permitirá proponer nuevas y posibles intervenciones higiénicas, sanitarias y terapéuticas.

Óxido nítrico y Hsp70 en aterosclerosis

El NO, una especie reactiva del nitrógeno de vida media ultracorta, participa como factor regulador de una diversa gama de funciones fisiológicas como el control de la resistencia vascular, la neurotransmisión y la modulación de procesos inflamatorios, entre otras^{11,26-30}. Bioquímicamente y a nivel citosólico, el NO es una molécula sintetizada por enzimas NOS con L-arginina, NADPH y O₂ como sustratos básicos³¹. Por otro lado, también se ha descrito una producción mitocondrial regulada por una isoforma local de NOS (mNOS) y/o por reacciones no enzimáticas con O₂ y ubiquinol (UQH₂)³². En comparación con otras especies reactivas, el NO tiene una alta difusión en sistemas biológicos dada su naturaleza lipofílica, carga neutra y una relativa baja reactividad³³. En la matriz mitocondrial, el NO reacciona con el anión superóxido (O₂⁻) dando peroxinitrito (ONOO⁻), que es un potente citotóxico fácilmente difusible desde el espacio intramitocondrial³⁴. Tanto el NO como el ONOO⁻ son pro-oxidantes que pueden conducir a estrés oxidativo y daño celular por oxidación y nitración de lípidos, proteínas, ADN y deterioro de la función mitocondrial³⁵.

El NO se genera en todo el organismo por diferentes isoformas de la enzima NOS, y es la producción local lo que determina sus acciones fisiológicas. Específicamente, la isoforma endotelial (eNOS) es abundante en el endotelio vascular, pero también se encuentra en cardiomocitos, neuronas, células epiteliales, adipocitos y hepatocitos^{36,37}. La isoforma inducible (iNOS), que tiene la mayor capacidad para generar NO, es —como su nombre lo refiere— de naturaleza inducible y se expresa en varios tipos celulares tales como macrófagos, en respuesta a estímulos inflamatorios por citoquinas, lipopolisacáridos y otros agentes inmunológicos. La expresión de iNOS se regula a nivel transcripcional y postranscripcional por vías de señalización que implican mediadores tales como el factor NF-kappa B o MAPK³⁸. Por último, la nNOS se expresa sobre todo en las neuronas, el músculo esquelético y las células epiteliales. Es una isoforma Ca₂/calmodulina dependiente que puede ser activada por agonistas del receptor de N-metil-D-aspartato³⁹. A diferencia de la isoforma inducible, tanto la neuronal como la endotelial se expresan constitutivamente, pero su actividad está regulada por la concentración de calcio intracelular. En consecuencia, la enzima iNOS, así como el propio NO, están involucrados en una variedad de estados patológicos agudos y/o crónicos tales como la inflamación, la isquemia-reperfusión, la diabetes, el cáncer, las enfermedades neurológicas, el envejecimiento y la enfermedad renal⁴⁰⁻⁴⁴. En este sentido, y a pesar de las controversias sobre efectos tóxicos o benéficos del NO, nuestro grupo comunicó inéditamente, en un modelo de enfermedad renal, disminución de la biodisponibilidad del NO con menor expresión de iNOS asociado a déficit de Hsp70 y significativa inducción de la apoptosis. En tanto que la administración *in vivo* de L-arginina indujo la expresión de Hsp70 asociada a menor apoptosis y reducción de la actividad de NADPH. Además verificamos incremento de la interacción Bcl₂ y Hsp70. Estos hallazgos sugirieron que NO puede producir resistencia a la muerte celular promovida por el modelo de enfermedad renal modulando señales de la mitocondria a través de la inducción Hsp70⁴⁵.

Hsp70 es una de las HSP más ubicua y altamente conservada. Las HSP son chaperonas moleculares constituidas por familias de polipéptidos que ayudan a moléculas dañadas en la recuperación de su conformación funcional. Se sintetizan en respuesta a diferentes factores de estrés como el calor, la hipotermia, la hipoxia, los radicales libres, la isquemia, el etanol, la radiación ultravioleta y la infección viral, entre los más estudiados⁴⁶. Protegen además a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de daños mediante la reducción de la oxidación y pueden modular función celular y la expresión génica contribuyendo a la homeostasis proteica⁴⁷. Otras funciones de interés incluyen la supresión de citoquinas proinflamatorias, reparación de canales iónicos, preservación de mitocondrias, membranas, retículo endoplasmático y núcleo. Finalmente, también participa en el transporte intracelular^{48,49}. Más específicamente, Hsp70 ayuda a las proteínas mal plegadas para que adopten su conformación nativa y recuperen su función. Además, protege a las proteínas nacientes, fomenta el transporte proteico de las organelas y reduce los agregados tóxicos⁵⁰. También, Hsp70 tiene un importante papel en la señalización de la respuesta inflamatoria e inmune⁵¹. En cuanto al estrés oxidativo y la apoptosis mitocondrial, estos pueden prevenirse por inducción de

Hsp70⁵². Esto resulta relevante desde que se conoce que las NADPH oxidasas participan activamente en el mecanismo de la inflamación, ya que catalizan la producción de O_2^- y otras especies reactivas del oxígeno (ERO), componentes ampliamente reconocidos como responsables principales del daño celular⁵³. En adición, un reciente estudio mostró que Hsp70 está relacionada con las complicaciones vasculares asociadas a la insulinorresistencia. Promueve la vasodilatación e inhibe la trombosis y la proliferación celular mediante el aumento de la angiotensina 1-7 a través de la expresión de eNOS⁵⁴. Por lo tanto, resulta protagónico el rol de Hsp70 en la modulación del proceso inflamatorio⁵⁵. Cabe destacar que el aumento de Hsp70 respondería a una elevación crónica de NO⁵⁶. Si esto se sostiene en el tiempo, aumentará la fosforilación de AKT, AMPK y eNOS, mejorando la biodisponibilidad del NO endógeno y optimizándose así la respuesta vasomotora y vasoprotectora⁵⁷. En contraposición, la insulinorresistencia y/o la diabetes se asocian con una alteración en los niveles del NO endotelial, lo que conduce a inflamación y aterosclerosis relacionada con el estrés oxidativo^{58,59}.

Por otro lado, un original reporte de Xu et al.⁶⁰, partiendo de la base de que las HSP se encuentran incrementadas en las células de músculo liso vascular durante la hipertensión aguda y la aterosclerosis con perturbaciones en los niveles del NO, propuso que el NO induciría la expresión de Hsp70 en dichas células a través de la activación de su factor de transcripción 1 (Hsf1). Específicamente, sugirió que la inducción de Hsp70 podría ser importante en la protección de las células musculares lisas lesionadas por sobreproducción de NO. Esto fue consistente con estudios ulteriores donde se evaluaron efectos pleiotrópicos de ciertas estatinas. Aquí se verificó la inducción y translocación nuclear de Hsf1 con el consecuente incremento de Hsp70, eNOS y trombomodulina⁶¹. Estos resultados contribuyen al conocimiento sobre la disfunción de la eNOS como un determinante clave de la aterosclerosis y que ciertas HSP inhiben la proliferación de células musculares lisas y participarían de la reparación vascular²⁵. Además, un estudio realizado sobre los efectos de un fármaco antiulceroso conocido como geranilgeranilacetona (GGA) en un modelo de aterosclerosis demostró supresión de iNOS en las células lisas vasculares estimuladas previamente por citoquinas a través de la modulación de NF-kappa B. Este efecto fue asociado también a la producción de Hsp70⁶². Por lo tanto, en estados inflamatorios tales como el proceso aterosclerótico (fig. 2), la modulación de los niveles del NO por inhibición de iNOS y/o la inducción de eNOS condicionaría la mayor expresión de Hsp70, y esto se vería reflejado en efectos protectores sobre el aparato cardiovascular.

Alimentos funcionales y salud cardiovascular

Si bien el concepto de alimentos funcionales fue introducido, es menester destacar que en la actualidad existen controversias respecto a trazar una línea que precise las características específicas de este grupo de alimentos que los diferencien del resto. En consecuencia, no se encuentra una definición de alimentos funcionales que sea universalmente aceptada y, por lo tanto, son escasas las regulaciones específicas en países de occidente⁶³. Diferente es la situación en oriente, donde los alimentos funcionales están

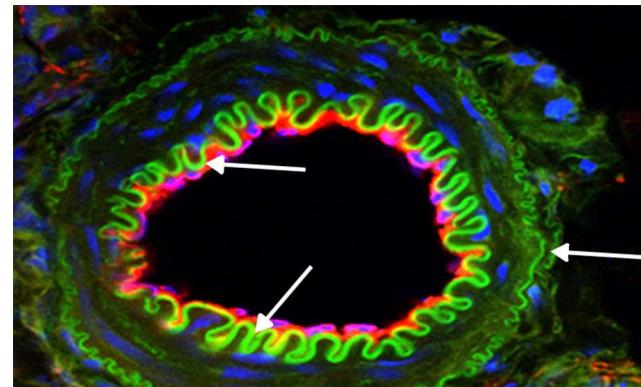


Figura 2 Expresión de proteínas de interés por inmunofluorescencia. Imagen representativa: vaso procedente de corteza renal de rata tratada durante 15 días con L-arginina. La mayor biodisponibilidad de NO indujo una significativa expresión verde de Hsp70 (flechas), y esto fue relacionado con una menor apoptosis y la reducción de la actividad de NADPH. Magnificación 600x.

regulados y son comercializados tras su aprobación con la identificación «FOOSH» (*Food for Specified Health Uses*). De interés, los beneficios atribuidos a estos alimentos vienen dados por componentes o ingredientes funcionales que tienen principios bioactivos capaces de prevenir diferentes patologías crónicas.

Los alimentos funcionales pueden ser de origen animal y/o vegetal. Los últimos destacan por su alto contenido de compuestos activos, además de aquellos que son considerados nutrientes (p. ej., vitaminas y minerales). En particular, se trata de compuestos fisiológicamente activos, producto del metabolismo secundario de vegetales, también denominados fitoquímicos. En función de sus estructuras químicas, se los agrupa como: terpenos, fenoles, alcaloides y compuestos azufrados, que ejercen efectos positivos sobre la salud humana⁶⁴. Entre los fitoquímicos que evidencian propiedades benéficas en relación con la salud cardiovascular —y en particular con la reducción de los niveles del colesterol— se pueden mencionar componentes tales como la proteína de soja, fibra soluble, vitaminas E, C, β -caroteno, compuestos fenólicos y los compuestos organoazufrados (OSC)^{65,66}. Además, y de particular interés, una revisión reciente⁶⁷ ha reunido evidencias que describen protección cardiovascular en pacientes asociada al consumo de compuestos tales como catequinas, flavonoides y aliina (un OSC), entre otros. En relación con los compuestos OSC, se hallan presentes en 2 tipos de cultivos: en los géneros *Brassicace* y *Allium*, evidenciando similitudes y diferencias para cada uno de ellos. Estos OSC han llamado la atención desde tiempos ancestrales, proponiéndose diversos destinos como alimentos, condimentos y la preparación de fitoterápicos. Los efectos benéficos asociados al consumo de *Allium*, como *Allium sativum* L. (ajo), son atribuidos a compuestos encontrados en las plantas cuando el tejido se halla intacto, odorantes formados durante la rotura de los tejidos, sustancias derivadas de reacciones posteriores, o bien productos de degradación metabólica de estos 3 tipos de compuestos⁶⁸.

Para comprender los efectos positivos en salud cardiovascular conviene referir que la biosíntesis de los OSC se inicia cuando el azufre es absorbido del suelo, luego

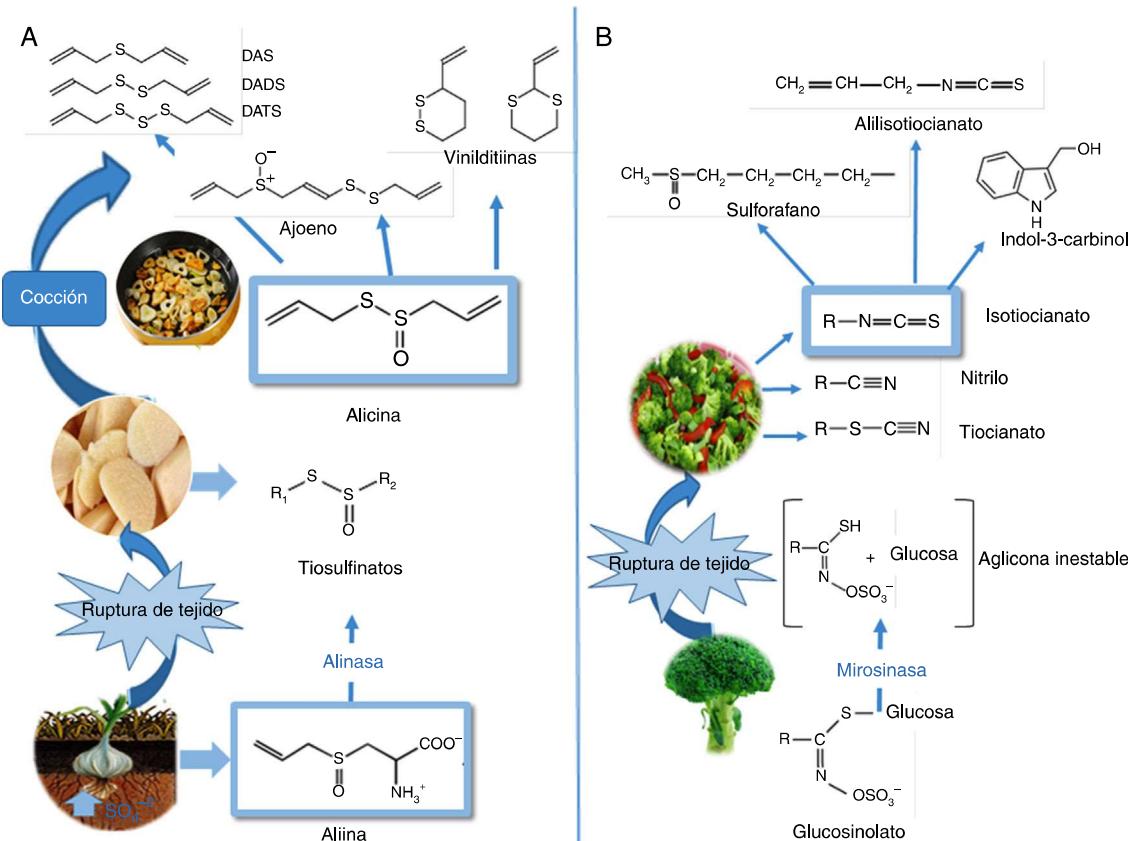


Figura 3 Fitoquímicos organoazufreados presentes en hortalizas de los géneros *Allium* sp. y *Brassica* sp. A) Estructuras químicas y transformaciones de los organoazufreados presentes en el ajo (*Allium sativum* L.). Biosíntesis de compuestos alquenil-cisteína-sulfóxidos (entre ellos, aliina), a partir de sulfato absorbido por las raíces. Lisis de aliina mediada por la enzima alinasa y producción de alicina. Descomposición de alicina mediante cocción. B) En *Brassica*, isotiocianatos formados como consecuencia de la hidrólisis de los glucosinolatos por la mirosinasa. En la figura se muestran los principales isotiocianatos que se forman en brócoli (*Brassica oleracea italica* L): sulforafano, indol-3-carbinol y alil-isotiocianato.

experimenta una serie de transformaciones metabólicas para generar diversos productos a posteriori almacenados como γ -glutamil-péptidos, y que más tarde se biotransforman en alquenil-cisteína-sulfóxidos (ACSO), también llamados compuestos precursores del flavor. Cuando el tejido de ajo fresco es dañado, la enzima alinasa (situada en las vacuolas) actúa sobre los ACSO (presentes en el citoplasma celular), liberando los tiosulfinatos, siendo en el ajo la alicina (dialil tiosulfinato) el producto que se encuentra en mayor proporción (65-75%) (fig. 3A). En consecuencia, muchas de las propiedades benéficas para la salud cardiovascular son atribuidas a este compuesto mayoritario, que a su vez se descompone para originar otra serie de productos como polisulfuros (mono, di y tri-sulfuros), ajoenos y vinilditiinas, que también evidencian propiedades protectoras. Además, múltiples estudios refieren que los efectos positivos sobre salud cardiovascular del ajo se observan cuando es consumido fresco⁶⁹ y/o cocido^{70,71}. Con especial atención a la presente revisión, numerosos trabajos se refieren a los efectos positivos del consumo de ajo y/o sus preparaciones sobre los perfiles de lípidos en sangre, incluyendo una reducción en el colesterol total, el cLDL, y un aumento en los niveles de HDL y triglicéridos⁷²⁻⁷⁴. En tanto que un estudio conducido por Gardner et al.⁷⁵ no constató beneficios equivalentes en pacientes adultos con hipercolesterolemia moderada.

Por otro lado, en el caso del género *Brassicae*, los OSC de importancia biológica se originan durante el procesado de los alimentos y/o la masticación, en donde la enzima mirosinasa (MS) (fig. 3B) entra en contacto con los glucosinolatos (GLS) hidrolizándolos y generando una aglicona, compuesto intermedio inestable (tiohidroxamato-O-sulfonato), el cual se convierte rápidamente en un amplio grupo de metabolitos bioactivos tales como: los isotiocianatos (ITC)⁷⁶, tiocianatos, nitrilos y cianoepitioalcanos. En relación a los ITC, la bibliografía describe una amplia variedad entre las distintas especies e incluso dentro de una misma especie⁷⁷.

Finalmente y en relación a los vegetales de la familia *Brassicaceae*, recientes evidencias demuestran propiedades relacionadas con la quimioprevisión del cáncer⁷⁸. También existen resultados que demuestran modulación de procesos inflamatorios, reducción de marcadores oxidativos, aumento del metabolismo de colesterol⁷⁹ y prevención de las ECV⁸⁰.

Alimentos funcionales, óxido nítrico y Hsp70 en aterosclerosis

El estado de conocimiento actual discute sobre las múltiples causas de la enfermedad ateroesclerótica; sin embargo, la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel

fundamental en la patogénesis de la disfunción endotelial que se atribuye comúnmente a una alteración en la disponibilidad de NO. En adición, Hsp70 protegería a los elementos celulares de la lesión mediante la reducción de la oxidación, la inflamación y la apoptosis³¹. Por lo tanto, existen evidencias concretas que sugieren al NO y a la proteína Hsp70 como elementos clave en el proceso inflamatorio y oxidativo que subyace a esta patología. En consecuencia, existe un creciente interés sobre los estudios de la implementación de dietas a base de los denominados alimentos funcionales y su impacto en patologías inflamatorias crónicas como la aterosclerosis. Al respecto, ha sido sugerido un papel emergente de las vías de NO y de Hsp70 vinculadas al uso de estos nutrientes especiales. Más específicamente y relacionado con ECV, el uso de los alimentos funcionales y/o nutracéuticos representa nuevos aportes al conocimiento, prevención y posible tratamiento. En este sentido, el ajo y la alicina son ampliamente reconocidos por su potencial terapéutico²³. La alicina ejerce protección asociada con reducción del estrés oxidativo, modulación del NO e incremento significativo de Hsp70²⁴. Esto es significativo desde que la disfunción de la enzima eNOS es uno de los determinantes primarios de la aterosclerosis, y además el hecho de que ciertas HSP que inhiben la proliferación de células musculares lisas participarían de la reparación vascular²⁵.

Con referencia a las vías del NO vinculado al uso de alimentos funcionales, previos y originales trabajos en ECV informaron que el ajo podría prevenir múltiples alteraciones, destacándose la inhibición de la agregación plaquetaria. Los estudios indicaban inhibición de la actividad de la ciclooxygenasa y la formación de tromboxano A₂, supresión de la movilización de Ca₂₊ plaquetario y aumento de los niveles de AMPc y GMPc. Por otro lado, el ajo también mostró propiedades antioxidantes y modulación de la actividad enzimática de la enzima NOS y su producto, el NO. Además, el ajo demostró propiedades como hipolipemiante y mejoró la disfunción endotelial. Los autores concluyeron que el ajo inhibe la agregación plaquetaria por múltiples mecanismos, y sugirieron que podría tener un papel en la prevención de la ECV^{82,83}. Más recientemente, el ajo ha sido caracterizado y reconocido por su inmenso potencial terapéutico con efectos positivos frente a un amplio espectro de enfermedades incluyendo el cáncer, la diabetes, infecciones microbianas, así como trastornos inmunológicos y ECV. En este sentido, un grupo importante de investigaciones sugieren reducción del riesgo cardiovascular y metabólico mediante la normalización de los lípidos plasmáticos, lipoproteínas oxidadas de baja densidad, modulación de la agregación plaquetaria, regulación de la presión arterial y prevención de la lesión cardiaca. Dichos beneficios responderían mayoritariamente al consumo de alimentos como el ajo, y por mecanismos directos y/o indirectos condicionarían la generación de sulfuro de hidrógeno y NO tanto en cardiomiositos como en células endoteliales⁸⁴. Además, estudios sobre hipertensión y el uso de compuestos activos del ajo demostraron mejoras en parámetros que incluyen el estrés oxidativo, la biodisponibilidad de NO, la producción de sulfuro de hidrógeno, la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, la expresión de NF-kappa B y la proliferación de células musculares lisas vasculares. Esta revisión sugiere que ciertos alimentos funcionales tienen propiedades medicinales

significativas con el potencial de mejorar la hipertensión y la morbilidad asociada⁸⁵. Por lo tanto, y en correspondencia con la naturaleza inflamatoria y oxidativa de la ECV, entre los conceptos emergentes sobre el uso de alimentos funcionales y salud cardiovascular destacan los efectos antioxidantes y antiinflamatorios que estos manifiestan. Así, el uso de alimentos funcionales como el ajo y sus derivados activos podría reducir el incremento de la producción de ERO, lo que restablecería la función vascular, mejoraría la permeabilidad vascular alterada y reduciría la inflamación, acompañado esto por la recuperación de la función moduladora vascular, el equilibrio entre la relajación vascular y la vasoconstricción, y la reducción de moléculas de adhesión inflamatorias⁸⁶. En este sentido, muy recientemente Lopez-Jaramillo⁸⁷ ha discutido el papel de la adiponectina en la ECV y destaca que la adiponectina se asociaría con un menor riesgo de enfermedad coronaria, con una mejora en la diferenciación de los preadipocitos/adipocitos y con aumento en la producción de NO endotelial. Además, el mismo autor propone y discute que la restricción calórica, el consumo moderado de alcohol y la dieta mediterránea incrementarían las concentraciones de adiponectina. Más específicamente, la administración de extracto de ajo envejecido y alimentos con pistachos podría aumentar las concentraciones de adiponectina en individuos con síndrome metabólico.

Por otro lado, y siguiendo nuestra línea de razonamiento, la evidencia actual sugiere que las HSP estarían implicadas en el mecanismo inmunológico e inflamatorio durante el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis. No obstante lo controversial de ciertas chaperonas moleculares como Hsp60 en la ECV, resulta relevante la participación de Hsp70 como citoprotectora tanto en estudios básicos^{17,81} como en estudios clínicos^{88,89}. Además, la asociación altos niveles de Hsp70 con bajo riesgo de enfermedad coronaria y gravedad de la misma fue independiente de los factores de riesgo tradicionales^{90,91}. Por lo tanto, resulta válido postular en ECV que una posible intervención higiénica, sanitaria y/o terapéutica que contribuya a modular la expresión de Hsp70 eventualmente podría mejorar la evolución de la misma o de cualquier enfermedad inflamatoria crónica⁹². En acuerdo con este postulado, un número importante de alimentos funcionales han sido estudiados intensamente y representan una alternativa útil para preservar la salud; en consecuencia, la inducción de Hsp70 a través de la dieta constituye un nuevo enfoque preventivo o incluso terapéutico en enfermedades inflamatorias⁹³, como lo demostró el uso de un compuesto tipo OSC soluble en agua, que indujo la expresión de Hsp70 y redujo la toxicidad inflamatoria inducida por paracetamol⁹⁴. También un estudio realizado en aterosclerosis demostró que una dieta rica en taurina inhibió la apoptosis miocárdica, y esto fue asociado con un aumento significativo de la Hsp70 miocárdica⁹⁵. Estos resultados fueron reforzados por otros estudios de compuestos biológicamente activos del ajo que demostraron protección por reducción del estrés oxidativo evidenciado por la disminución de las ERO, peroxidación lipídica y preservación de la actividad de las enzimas antioxidantes. Dichos eventos fueron también vinculados directamente con una significativa inducción de Hsp70 y la consecuente modulación del NO²⁴. Resultados preliminares aún no publicados de nuestro laboratorio y en colaboración con el Dr. Lahera confirmaron la

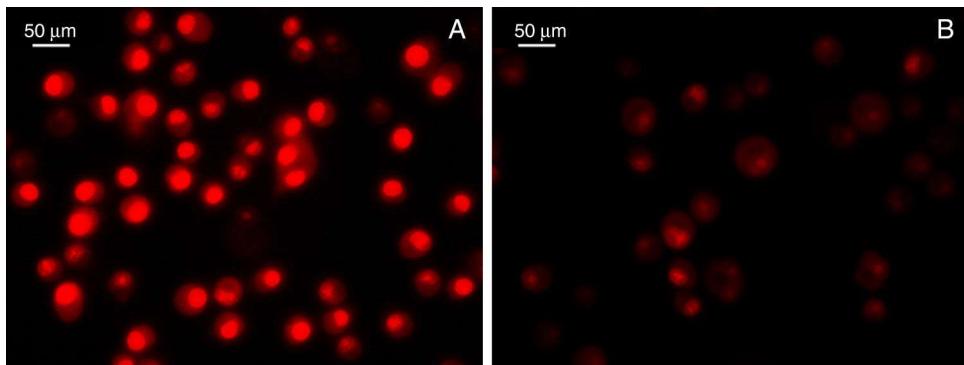


Figura 4 Detección de la producción del anión superóxido. Se utilizó el colorante fluorescente dihidroetidio (DHE; Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU.), y un score de la intensidad del color rojo permitió evaluar la producción del anión superóxido en cultivo de células Bv-2 gliales de ratón sometidas a lesión por lipopolisacáridos en ausencia (A) o presencia (B) de alicina.

modulación del estrés oxidativo asociado al uso de principios activos del ajo con reducción de marcadores inflamatorios (fig. 4).

Conclusiones y perspectivas

El estado de conocimiento actual reconoce un importante número de causas de la enfermedad ateroesclerótica. Sin embargo, la inflamación y el estrés oxidativo destacan como determinantes fundamentales en la patogénesis de la disfunción endotelial atribuida comúnmente a una alteración en la disponibilidad de NO. En adición, Hsp70 protegería a los elementos celulares de la lesión mediante la reducción de la oxidación, la inflamación y la apoptosis. De interés, se encuentran en constante revisión las posibles terapéuticas. En tal sentido, el NO, un conocido gas mensajero vasoactivo, ha sido estrechamente relacionado con el proceso inflamatorio, oxidativo y disfuncional mitocondrial propio de la aterosclerosis. Por otro lado, muy recientemente se ha demostrado que alteraciones en la biodisponibilidad del NO inducirían la expresión de HSP. Este mecanismo podría ser inducido también por el uso de ciertos alimentos funcionales como estrategia para prevenir el envejecimiento vascular así como el desarrollo de aterosclerosis. Específicamente, alimentos funcionales como la alicina ejercerían protección asociada a reducción del estrés oxidativo, modulación del NO e incremento significativo de Hsp70. Esto es relevante desde que se sabe que la disfunción de la enzima eNOS es causa primaria de la aterosclerosis y que ciertas HSP inhiben la proliferación de células musculares lisas y participarían de la reparación vascular. Finalmente, el mayor conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la aterosclerosis nos permitirá proponer nuevas estrategias higiénicas, sanitarias y terapéuticas, como la implementación de alimentos saludables.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses potencial con respecto a la investigación, la autoría y/o la publicación de este artículo de revisión.

Bibliografía

1. Raines EW, Ferri N. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res.* 2005;46: 1081–92.
2. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation.* 2001;104:2746–53.
3. Grant JF, Martin SA, Taylor AW, Wilson DH, Araujo A, Adams RJ, et al. Cohort profile: The Men Androgen Inflammation Lifestyle Environment and Stress (MAILES) study. *Int J Epidemiol.* 2014;43:1040–53.
4. Lubrano V, Balzan S. Consolidated and emerging inflammatory markers in coronary artery disease. *World J Exp Med.* 2015;5:21–32.
5. Sypniewska G. Laboratory assessment of cardiometabolic risk in overweight and obese children. *Clin Biochem.* 2015;48:370–6.
6. Van Rooy MJ, Pretorius E. Obesity, hypertension and hypercholesterolemia as risk factors for atherosclerosis leading to ischemic events. *Curr Med Chem.* 2014;21:2121–9.
7. Mikhed Y, Daiber A, Steven S. Mitochondrial oxidative stress, mitochondrial DNA damage and their role in age-related vascular dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2015;16:15918–53.
8. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* 2015;6:109–20.
9. Schramm A1, Matusik P, Osmenda G, Guzik TJ. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol.* 2012;56:216–31.
10. Costantino S, Paneni F, Lüscher TF, Cosentino F. Pin1 inhibitor Juglone prevents diabetic vascular dysfunction. *Int J Cardiol.* 2016;203:702–7.
11. Mazzei L, Docherty NG, Manucha W. Mediators and mechanisms of heat shock protein 70 based cytoprotection in obstructive nephropathy. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20:893–906.

12. Manucha W, Vallés P. Hsp70/nitric oxide relationship in apoptotic modulation during obstructive nephropathy. *Cell Stress Chaperones*. 2008;13:413–20.
13. Nakamura T, Lipton SA. S-Nitrosylation and uncompetitive/fast off-rate (UFO) drug therapy in neurodegenerative disorders of protein misfolding. *Cell Death Differ*. 2007;14:1305–14.
14. Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology*. 2003;125:1480–91.
15. Wang Y, Vodovotz Y, Kim PK, Zamora R, Billiar TR. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;962:415–22.
16. Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: Role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull*. 2001;24:1–9.
17. Deniset JF, Pierce GN. Heat shock proteins: Mediators of atherosclerotic development. *Curr Drug Targets*. 2015;16:816–26.
18. Galović R, Flegar-Meštrić Z, Vidjak V, Matokanović M, Barišić K. Heat shock protein 70 and antibodies to heat shock protein 60 are associated with cerebrovascular atherosclerosis. *Clin Biochem*. 2016;49:66–9.
19. Accardi G, Aiello A, Gambino CM, Virruso C, Caruso C, Candore G. Mediterranean nutraceutical foods: Strategy to improve vascular ageing. *Mech Ageing Dev*. 2016, pii: S0047-6374(16)30011-2, [Epub ahead of print].
20. Okreglicka K. Health effects of changes in the structure of dietary macronutrients intake in western societies. *Roczn Panstw Zakl Hig*. 2015;66:97–105.
21. Goldberg I. Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. Springer; 1994. Series: Diet therapy.
22. Vranešić-Bender D. The role of nutraceuticals in anti-aging medicine. *Acta Clin Croat*. 2010;49:537–44.
23. Butt MS, Sultan MT, Butt MS, Iqbal J. Garlic: Nature's protection against physiological threats. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009;49:538–51.
24. Liu SG, Ren PY, Wang GY, Yao SX, He XJ. Allicin protects spinal cord neurons from glutamate-induced oxidative stress through regulating the heat shock protein 70/inducible nitric oxide synthase pathway. *Food Funct*. 2015;6:321–30.
25. McCullagh KJ, Cooney R, O'Brien T. Endothelial nitric oxide synthase induces heat shock protein HSPA6 (HSP70B') in human arterial smooth muscle cells. *Nitric Oxide*. 2016;52:41–8.
26. Hussin AM, Ashor AW, Schoenmakers I, Hill T, Mathers JC, Siervo M. Effects of vitamin D supplementation on endothelial function: A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Eur J Nutr*. 2016 [Epub ahead of print].
27. Lai L, Ghebremariam YT. Modulating DDAH/NOS pathway to discover vasoprotective insulin sensitizers. *J Diabetes Res*. 2016;2016:1982096, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1982096>.
28. Bradley SA, Steinert JR. Nitric oxide-mediated posttranslational modifications: Impacts at the synapse. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5681036, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5681036>.
29. Manucha W. Mitochondria and oxidative stress participation in renal inflammatory process. *Medicina (B Aires)*. 2014;74:254–8.
30. Molina MN, Ferder L, Manucha W. Emerging role of nitric oxide and heat shock proteins in insulin resistance. *Curr Hypertens Rep*. 2016;18:1, <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-015-0615-4>.
31. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109–42.
32. Poderoso JJ, Lisdero C, Schopfer F, Riobo N, Carreras MC, Cadenas E, et al. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem*. 1999;274:37709–16.
33. Boveris A, Valdez LB, Zaibornij T, Bustamante J. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:535–42.
34. Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol*. 1997;10, 1285–1192.
35. Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C670–86.
36. Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: Partners and pathways. *Cardiovasc Res*. 2007;75:247–60.
37. Sisbury BE, Cummins TD, Tang Y, Hellmann J, Holden CR, Harbeson MA, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. *Circ Res*. 2012;111:1176–89.
38. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593–615.
39. Sadler CJ, Wilding JP. Reduced ventromedial hypothalamic neuronal nitric oxide synthase and increased sensitivity to NOS inhibition in dietary obese rats: Further evidence of a role for nitric oxide in the regulation of energy balance. *Brain Res*. 2004;1016:222–8.
40. Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2008;37:685–711.
41. Valles PG, Manucha WA. H⁺-ATPase activity on unilateral ureteral obstruction: Interaction of endogenous nitric oxide and angiotensin II. *Kidney Int*. 2000;58:1641–51.
42. Valles PG, Pascual L, Manucha W, Carrizo L, Rüttler M. Role of endogenous nitric oxide in unilateral ureteropelvic junction obstruction in children. *Kidney Int*. 2003;63:1104–15.
43. Manucha W, Oliveros L, Carrizo L, Seltzer A, Valles P. Losartan modulation on NOS isoforms and COX-2 expression in early renal fibrogenesis in unilateral obstruction. *Kidney Int*. 2004;65:2091–107.
44. Vallés PG, Manucha W, Carrizo L, Vega Perugorria J, Seltzer A, Ruete C. Renal caveolin-1 expression in children with unilateral ureteropelvic junction obstruction. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:237–48.
45. Manucha W, Vallés PG. Cytoprotective role of nitric oxide associated with Hsp70 expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide*. 2008;18:204–15.
46. Macario AJL, Conway de Macario E. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med*. 2005;353:1489–501.
47. Morimoto RI. The heat shock response: Systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:91–9.
48. Tytell M, Hooper PL. Heat shock proteins: New keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets*. 2001;5:267–87.
49. Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*. 1999;79:425–49.
50. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013;34:1181–8.
51. Borges TJ, Lopes RL, Pinho NG, Machado FD, Souza AP, Bonorino C. Extracellular Hsp70 inhibits pro-inflammatory cytokine production by IL-10 driven down-regulation of C/EBP β and C/EBP α . *Int J Hyperth*. 2013;29:455–63.
52. Rinaldi Tosi ME, Bocanegra V, Manucha W, Gil Lorenzo A, Valles PG. The Nrf2-Keap1 cellular defense pathway and heat shock protein 70 (Hsp70) response. Role in protection against oxidative stress in early neonatal unilateral ureteral obstruction (UUO). *Cell Stress Chaperones*. 2011;16:57–68.
53. Ferder L, Inserra F, Martinez-Maldonado M. Inflammation and the metabolic syndrome: Role of angiotensin II and oxidative stress. *Curr Hypertens Rep*. 2006;8:191–8.

54. Karpe PA, Tikoo K. Heat shock prevents insulin resistance induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. *Diabetes*. 2014;63:1124-39.
55. Chow AM, Steel R, Anderson RL. Hsp72 chaperone function is dispensable for protection against stress-induced apoptosis. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14:253-63.
56. Hooper PL, Balogh G, Rivas E, Kavanagh K, Vigh L. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19:447-64.
57. Krause M, Ludwig MS, Heck TG, Takahashi HK. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: Pros and cons. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18:374-80.
58. Nakhjavani M, Morteza A, Khajeali L, Esteghamati A, Khalizadeh O, Asgarani F, et al. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15:959-64.
59. Bhatia S, Shukla R, Venkata Madhu S, Kaur Gambhir J, Madhava Prabhu K. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem*. 2003;36:557-62.
60. Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J Clin Invest*. 1997;100:1089-97.
61. Uchiyama T, Atsuta H, Utsugi T, Oguri M, Hasegawa A, Nakamura T, et al. HSF1 and constitutively active HSF1 improve vascular endothelial function (heat shock proteins improve vascular endothelial function). *Atherosclerosis*. 2007;190:321-9.
62. Yamamoto K, Sarukawa M, Ito T, Aoki H, Ichida M, Shimada K. An anti-ulcer drug, geranylgeranylacetone, suppresses inducible nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 2005;23:1847-53.
63. Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. A review. *Appetite*. 2008;51:456-67.
64. Crozier A, Clifford M, Ashihara H. Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blakwell Publishing Ltd.; 2006.
65. Hasler CM. Functional foods: Benefits, concerns and challenges. A position paper from the American Council on Science and Health. *J Nutr*. 2002;132:3772-81.
66. Badimon L, Vilahur G, Padro T. Nutraceuticals and atherosclerosis: Human trials. *Cardiovasc Ther*. 2010;28:202-15.
67. Cicero AFG, Colletti A. Role of phytochemicals in the management of metabolic syndrome. *Phytomedicine*. 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.009>, pii: S0944-7113(15)00361-X, [Epub ahead of print].
68. Block E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* — implications for organic sulfur chemistry. *Angew Chem., Int. Ed. Engl.* 1992;31:1135-78.
69. González R, Soto V, Sance M, Camargo A, Galmarini C. Variability of solids, organosulfur compounds, pungency and health-enhancing traits in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars belonging to different ecophysiological groups. *J Agric Food Chem*. 2009;57:10282-8.
70. Locatelli D, Altamirano J, González R, Camargo A. Home-cooked garlic remains a healthy food. *J Funct Foods*. 2015;16:1-8.
71. Cavagnaro P, Camargo A, Galmarini C, Simon P. Effect of cooking on garlic (*Allium sativum* L.) antiplatelet activity and thiosulfinate content. *J Agric Food Chem*. 2007;55:1280-8.
72. Peleg A, Hershcovici T, Lipa R, Anbar R, Redler M, Beigel Y. Effect of garlic on lipid profile and psychopathologic parameters in people with mild to moderate hypercholesterolemia. *Isr Med Assoc J*. 2003;5:637-40.
73. Ashraf R, Aamir K, Shaikh AR, Ahmed T. Effects of garlic on dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2005;17:60-4.
74. Kojuri J, Vosoughi AR, Akrami M. Effects of *Anethum graveolens* and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. *Lipids Health Dis*. 2007;6:5.
75. Gardner CD, Lawson LD, Block E, Chatterjee LM, Kiazzand A, Balise RR, et al. Effect of raw garlic vs commercial garlic supplements on plasma lipid concentrations in adults with moderate hypercholesterolemia: A randomized clinical trial. *Arch Intern Med*. 2007;167:346-53.
76. Fusari C, Locatelli D, Altamirano J, Camargo A. UAE-HPLC-UV. New contribution for fast determination of total isothiocyanates in Brassicaceae vegetables. *J Chem*. 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/294601> [Epub ahead of print].
77. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 2001;56:5-51.
78. Manchali S, Murthy KC, Patil B. Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *J Funct Foods*. 2012;4:94-106.
79. Murashima M, Watanabe S, Zhuo X, Uehara M, Kurashige A. Phase I study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *BioFactors*. 2004;22:271-5.
80. Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: The women's health study. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:922-8.
81. Bielecka-Dabrowa A, Barylski M, Mikhailidis DP, Rysz J, Banach M. HSP 70 and atherosclerosis—protector or activator? *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13:307-17.
82. Rahman K. Effects of garlic on platelet biochemistry and physiology. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:1335-44.
83. Gorinstein S, Jastrzebski Z, Namiesnik J, Leontowicz H, Leontowicz M, Trakhtenberg S. The atherosclerotic heart disease and protecting properties of garlic: Contemporary data. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:1365-81.
84. Khatua TN, Adela R, Banerjee SK. Garlic and cardioprotection: Insights into the molecular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91:448-58.
85. Shouk R, Abdou A, Shetty K, Sarkar D, Eid AH. Mechanisms underlying the antihypertensive effects of garlic bioactives. *Nutr Res*. 2014;34:106-15.
86. Bielli A, Sciolli MG, Mazzaglia D, Doldo E, Orlandi A. Antioxidants and vascular health. *Life Sci*. 2015;143:209-16.
87. Lopez-Jaramillo P. The role of adiponectin in cardiometabolic diseases: Effects of nutritional interventions. *J Nutr*. 2016;146:422S-6S.
88. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest*. 1998;27:367-77.
89. Shin YO, Bae JS, Lee JB, Kim JK, Kim YJ, Kim C, et al. Effect of cardiac rehabilitation and statin treatment on anti-HSP antibody titers in patients with coronary artery disease after percutaneous coronary intervention. *Int Heart J*. 2006;47:671-82.
90. Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, Csako G, Rott D, Zalles-Ganley A, et al. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1055-9.
91. Martin-Ventura JL, Leclercq A, Blanco-Colio LM, Egido J, Rossignol P, Meilhac O, et al. Low plasma levels of HSP70 in patients with carotid atherosclerosis are associated with increased levels of proteolytic markers of neutrophil activation. *Atherosclerosis*. 2007;194:334-41.
92. Calabrese V, Cornelius C, Cuzzocrea S, Iavicoli I, Rizzarelli E, Calabrese EJ. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol Aspects Med*. 2011;32:279-304.

93. Van Eden W. Diet and the anti-inflammatory effect of heat shock proteins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15:31–6.
94. Sumioka I, Matsura T, Yamada K. Therapeutic effect of S-allylmercaptocysteine on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Eur J Pharmacol*. 2001;433:177–85.
95. Setyarani M1, Zinelli A, Carru C, Zulli A. High dietary taurine inhibits myocardial apoptosis during an atherogenic diet: Association with increased myocardial HSP70 and HSF-1 but not caspase 3. *Eur J Nutr*. 2014;53:929–37.