

Recibido: 20/11/2018
Aceptado: 4/02/2019
Publicado: 26/04/2019Franklin E. Torres J.¹
José Luis Villarreal C.²
Axel A. Tolstano³
Edward Lozano H.⁴
Álvaro Peinado⁵
Xavier Lastra P.⁶**Correspondencia:**

1. Docente Investigador, Programa de Medicina, Universidad Libre de Barranquilla
ftorres@unilibreaq.edu.co
2. Docente Investigador, Programa de Medicina, Universidad Libre de Barranquilla
3. Cirugía Cardiovascular y Angiología. IPS Organización Clínica General del Norte (OCGN) de Barranquilla
4. Cirugía Cardiovascular. Jefe de Unidad del Corazón. IPS Organización Clínica General del Norte, Barranquilla
5. Laboratorio de patología. Docente - Programa de Medicina - Universidad Libre de Barranquilla
6. Clínica de la Costa, Barranquilla - Colombia

DOI:<https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.1.5321>**Cómo citar:**

Torres J., F., Villarreal C., J., Tolstano, A., Lozano H., E., Peinado V., Álvaro, & Lastra P, X. (2019). IDENTIFICACIÓN DE HELICOBACTER PYLORI A PARTIR DE LESIÓN ATEROSCLERÓTICA CORONARIA HUMANA. *Biociencias*, 14(1), 27-39.
<https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.1.5321>

Open Access

@Copyright: Revista Biociencias 2019

Resumen

Introducción: El principal mecanismo patogénico que subyace la génesis y desarrollo de enfermedades del sistema circulatorio es la aterosclerosis. Es un proceso patológico complejo y progresivo de la pared arterial que afecta especialmente a las arterias coronarias, cerebrales y periféricas. Actualmente se habla sobre "La hipótesis infecciosa de la aterosclerosis". La infección por *Helicobacter pylori* ha sido una de las más investigadas a nivel global. **Objetivo:** Identificar *H. pylori* a partir de lesiones ateroscleróticas de pacientes que acuden a los servicios de cirugía cardiovascular y angiología de la ciudad de Barranquilla. **Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en una muestra de 102 participantes. Los ateromas fueron tomados por personal experto en endarterectomía y disección de vasos sanguíneos. Los especímenes fueron embebidos en solución formaldehído al 4%. Se realizó extracción de ADN a partir de ateromas. El diagnóstico molecular de *H. Pylori* se realizó por PCR ANIDADA, evidenciando un fragmento de 120 pb posterior a la electroforesis en gel de agarosa al 3,5% en TBE 0,5X. **Resultados:** Se obtuvieron 102 muestras de ateromas. Una muestra resultó positiva para *H. pylori* (Muestra #14; 1/102). El tejido aterosclerótico fue obtenido a partir de arteria coronaria derecha. **Conclusión:** La hipótesis infecciosa de la aterosclerosis ha sido uno de los principales temas de investigación a nivel mundial en las últimas décadas. La infección por *H. pylori* es un factor de riesgo, sin embargo, varios estudios son necesarios para poder concluir de manera más precisa.

Palabras Clave: Enfermedad aterosclerótica; Aterosclerosis; Inflamación, infección, *Helicobacter pylori*.

Abstract

Introduction: The main pathogenic mechanism underlying the genesis and development of diseases of the circulatory system is atherosclerosis. It is a complex and progressive pathological process of the arterial wall that affects especially the coronary, cerebral and peripheral arteries. Currently, there is talk about "The infectious hypothesis of atherosclerosis". *Helicobacter pylori* infection has been one of the most researched worldwide. **Objective:** To identify *H. pylori* from atherosclerotic lesions of patients who attend the cardiovascular and angiology services of the city of Barranquilla. **Methods:** A descriptive cross-sectional study was carried out. In a sample of 102 participants. The atheromas were taken by expert personnel in endarterectomy and dissection of blood vessels. The specimens were embedded in 4% formaldehyde solution. DNA extraction was performed from atheromas. The molecular diagnosis of *H. pylori* was performed by ANIDADA PCR, evidencing a 120 bp fragment after electrophoresis in a 3.5% agarose gel in 0.5X TBE. **Results:** 102 samples of atheromas were obtained. One sample was positive for *H. pylori* (Sample # 14, 1/102). The atherosclerotic tissue was obtained from the right coronary artery. **Conclusion:** The infectious hypothesis of atherosclerosis has been one of the main research topics worldwide in recent decades. *H. pylori* infection is a risk factor, however, several studies are necessary to be able to conclude more accurately.

Keywords: Atherosclerotic disease; Atherosclerosis; Inflammation; Infection; *Helicobacter pylori*.

INTRODUCCIÓN

En el Departamento del Atlántico, especialmente el Distrito de Barranquilla, las enfermedades isquémicas del corazón representan la principal causa de muerte a nivel general de la población (1). Aproximadamente 1.116 defunciones reportadas en el 2009, con una tasa de mortalidad de 59,6 por cada 100 mil habitantes. Le siguen las enfermedades cerebrovasculares, con un total de 645 defunciones y una tasa de mortalidad de 34,4 por cada 100 mil habitantes. En tercer lugar, se encuentran las agresiones (homicidios) con 463 muertes y una tasa de mortalidad de 24,7 por cada 100 mil habitantes respectivamente (2).

El análisis de la situación de salud del Distrito de Barranquilla año 2016, en lo concerniente al análisis de mortalidad general por grandes causas, determinó que los motivos que tienen mayor peso son las enfermedades del sistema circulatorio, con una tasa que llegó a ser de 183,8 en el 2005 y 181,17 en el 2014 (3).

El principal mecanismo patogénico que subyace la génesis y desarrollo de enfermedades del sistema circulatorio es la aterosclerosis (4), la cual es considerada como un proceso patológico complejo y progresivo de la pared arterial que afecta especialmente a las arterias coronarias, cerebrales y periféricas (5). Las lesiones vasculares ateroscleróticas son el resultado de complejas interacciones entre células inflamatorias, plaquetas, elementos vasculares y lipoproteínas que regulan la expresión de genes y proteínas directamente involucradas en el proceso de remodelado vascular (6); lo cual conlleva a la estenosis y/o oclusión de la luz del vaso afectado generando hipoxia y necrosis isquémica en órganos vitales como corazón y cerebro.

Fisiopatológicamente la aterosclerosis se inicia con la disfunción del endotelio vascular inducida por la alteración bioquímica de las lipoproteínas de baja densidad (LD). En lo específico por la oxidación de las LDL mediada por diversos factores desencadenantes como son: Incremento de las fuerzas de estrés sobre la pared vascular, hipertensión arterial, diabetes mellitus, sobrepeso, tabaquismo, infecciones, entre otros factores que generan una respuesta inflamatoria endotelial (7). Este proceso genera la lesión básica que es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias (8). A medida que el proceso inflamatorio persiste se evidencian cambios histopatológicos en la placa que favorecen la inestabilidad de esta, trayendo como consecuencia la rotura, hemorragia y formación de trombos, lo que se conoce como “Evento aterotrombótico” (9, 10), íntimamente relacionado con los diversos fenotipos clínicos de ECV como lo es el infarto agudo al miocardio tipo 1 (IAM tipo I) y accidentes cerebro vasculares de tipo isquémico (11, 12).

En las últimas décadas se han hecho esfuerzos extraordinarios por diferentes laboratorios de investigación a nivel mundial, en aras de discernir de manera precisa y exacta la biología molecular y eventos que inician y desarrollan la lesión aterosclerótica (13). Por mucho tiempo se pensó que se trataba de un evento netamente crónico no transmisible ligado íntimamente con el estilo de vida y algunas condiciones bioquímicas y metabólicas de cada paciente (14). Sin embargo, las evidencias observadas en los últimos años hacen de este proceso un evento altamente complejo en donde también pueden participar agentes de tipo infeccioso en la etiopatogenia de la aterosclerosis (15). Actualmente se habla en el argot científico sobre “La hipótesis infecciosa de la lesión aterosclerótica”, como posible causa o factor de riesgo responsable de las enfermedades vasculares a nivel cardiaco y cerebral (16).

De los diversos patógenos relacionados con la aterogénesis, la infección por *Helicobacter*

pylori (*H. pylori*) ha sido una de las más investigadas a nivel global (17). Se ha demostrado que la presencia de *H. pylori* es un factor de riesgo para el desarrollo de lesión aterosclerótica y enfermedades vasculares asociadas a esta (18). Existe evidencia directa e indirecta por la cual *H. pylori* podría desencadenar eventos proinflamatorios a nivel endotelial que favorecería la lesión aterosclerótica (19). Teniendo en cuenta la alta prevalencia de infección por *H. pylori* en nuestra población, al igual que la alta prevalencia de enfermedades circulatorias relacionadas con aterosclerosis, se decide investigar la presencia de *H. pylori* a partir de lesiones ateroscleróticas de pacientes que acuden a los servicios de cirugía cardiovascular y angiología de la ciudad de Barranquilla.

MÉTODOS

Selección de pacientes:

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en una muestra de 102 individuos, mayores de 35 años, de ambos sexos, que acuden a los servicios de cirugía cardiovascular y angiología en la IPS Organización Clínica General del Norte (OCGN) y Clínica de la Costa de Barranquilla. Todos los participantes respondieron al consentimiento informado y a una entrevista estructurada para evaluar condiciones antropométricas, clínicas y de historia familiar. Fueron excluidos del estudio individuos con edad inferior a 35 años, gestantes, obesos mórbidos ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) y todos aquellos que estén en tratamiento para enfermedades de la tiroides, reumáticas, hepáticas y neoplásicas.

Obtención y preparación del tejido aterosclerótico:

Las muestras fueron tomadas por profesionales expertos en cirugía cardiovascular y angiología, por medio de técnicas de endarterectomía y/o disección del vaso afectado según la patología subyacente en cada paciente. Los especímenes fueron embebidos en solución de formaldehído al 4% y transportados al laboratorio de Biología molecular de la Universidad Libre para su posterior análisis. Se realizó extracción de ADN a partir de los ateromas obtenidos usando el kit comercial PureGenome™ Tissue DNA Extraction, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Diagnóstico molecular de *Helicobacter Pylori* a partir de ateromas

Las condiciones de reacción para la amplificación de *Helicobacter pylori* por PCR ANIDADA fueron las siguientes:

Fragmento externo:

segmento específico del gen *ureA* en el genoma de *H. pylori*, que se amplifica mediante el primer par de cebadores para obtener amplicones de 279 pb.

Fragmento interno:

segmento de 120 pb que se obtiene en la segunda ronda de amplificación, utilizando cebadores que hibridan dentro del fragmento externo obtenido en la primera amplificación.

Técnica realizada por García A. 2010, modificada para uso de máster mix PROMEGA (20).

Dispensar en un tubo de reacción de 200 μl o un tubo de centrífuga de 1.5 ml, el agua, la máster mix y los cebadores para obtener una solución final 17.5 μl aproximadamente (Ver tabla 1.) Este paso se debe realizar dentro de la cabina de flujo. Luego, continuar con la incubación en el termociclador. Tener en cuenta la siguiente tabla 1:

Tabla 1. Reactivos y concentraciones necesarias para preparar un tubo de reacción.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Cantidad por tomar (μ l)
Master mix	2X	-	10
Cebador externo (Forward)	50 pm	1.0 pm	1,2
Cebador externo Reverse	50 pm	1.0 pm	1,2
ADN	10 ²	-	3
Agua	-	7.5	9,1
Control interno			2,5
Volumen total			30

Fuente: Elaborado por los autores

Tabla 2. Perfil de temperatura para la PCR.

ETAPA	TEMPERATURA °C	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5	
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	55	1	
Extensión	72	1	Regresar 'Desnaturalización' por 35 ciclos
Extensión final	72	10	

Fuente: Elaborado por los autores

1. Colocar los tubos en el termociclador y programar los ciclos, según Tabla 2.
2. Correr los productos en gel de agarosa al 3.5% (preparada en tampón TBE al 0.5X), tampón de corrido TBE al 1X, 90 Voltios, 110 miliamperios y 50 minutos.

3. Visualizar con bromuro de etidio una vez finalizado el corrido.

4. Segmento Interno: Tomar 3 μ l del producto de la primera amplificación y realice una segunda empleando el segundo par de cebadores teniendo en cuenta la siguiente Tabla 3:

Tabla 3. Reactivos y concentraciones necesarias para preparar un tubo de reacción.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Cantidad por tomar (μ l)
Máster mix	2X	-	10
Cebador externo (Forward)	50 pm	1.0 pm	1
Cebador externo Reverse	50 pm	1.0 pm	1
ADN	10 ²	-	2,5
Agua	-	7.5	7,5
Volumen total			27

Fuente: Elaborado por los autores

Tabla 4. Perfil de temperatura para la PCR

ETAPA	TEMPERATURA °C	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5	
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	55	1	
Extensión	72	1	Regresar 'Desnaturalización' por 30 ciclos
Extensión final	72	10	

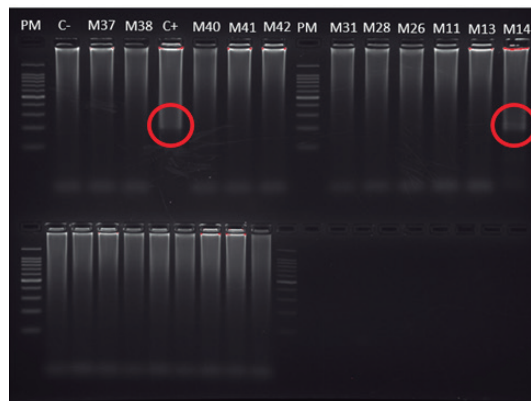
Fuente: Elaborado por los autores

5. Colocar los tubos en el termociclador y programar los ciclos, ver Tabla 4.
6. Correr los productos en gel de agarosa al 3.5% (preparada en tampón TBE al 0.5X), tampón de corrido TBE al 1X, 90 Voltios, 110 miliamperios y 50 minutos.
7. Visualizar con bromuro de etidio una vez finalizado el corrido en electroforesis horizontal en gel de agarosa.

RESULTADOS

En total se obtuvieron 102 muestras de ateromas. Solo una resultó positiva para *H. pylori* (1/102). La muestra que resultó positiva fue la número 14 (Ver figura 1), la cual corresponde a masculino de 61 años, con diagnóstico de dislipidemia, revascularización coronaria (bypass coronario) hace 16 años. Paciente hipertenso, con índice de masa corporal normal, sin diabetes, no alcohol, no tabaco. El tejido aterosclerótico fue obtenido a partir de arteria coronaria derecha.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 3,5% en TBE 0.5X. PM: Marcador de peso molecular; C- : Control negativo (agua destilada); C+ : Control positivo para *H. pylori*; M14: Muestra número 14.



Fuente: Elaboración de los autores

DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria gramnegativa que coloniza la mucosa gástrica del ser humano, que en los últimos 28 años ha sido identificado como un factor de riesgo esencial para varias enfermedades, entre ellas la úlcera péptica y el cáncer gástrico (21). Se ha documentado que *H. pylori* podría participar en otras enfermedades extradi digestivas. Por ejemplo: patologías hematológicas, cardiovasculares, dermatológicas, neurológicas, entre otras (22).

En lo concerniente a las enfermedades cardiovasculares, se ha demostrado científicamente que la infección por *H. pylori* podría influir en el origen y desarrollo de Aterosclerosis, Enfermedad coronaria, Síndrome coronario agudo, Ictus cerebral y Trombosis venosa profunda (23, 24).

Ayada y cols, evidenciaron (en modelos animales) que la infección por *H. pylori* condiciona un ambiente proinflamatorio a nivel endotelial que favorece la oxidación de las lipoproteínas de

baja densidad (LDL) y en consecuencia la aterogénesis (25). Se evidenció una respuesta inmune celular mediada por LT-CD4+ que polariza la respuesta hacia un perfil h1 con secreción de citoquinas proinflamatorias las cuales favorecen la oxidación de las LDL a nivel del endotelio vascular. También se evidenció una respuesta inmune de tipo humoral con secreción de IgG2a capaz de reconocer por mimetismo molecular proteína del shock térmico humana de 60 kd (HSP 60) expresada sobre la íntima vascular. Al parecer ambas respuestas, tanto celular como humoral, favorecen la aterogénesis en modelos animales *apoe+/-ldlr+/-*.

Varios estudios han demostrado que los pacientes con enfermedad coronaria aterosclerótica (ECA) tienen alta prevalencia de infección por *H. pylori* (26,27). Vijayvergiya y cols (27) demostraron que los pacientes con ECA tenían mayor seropositividad IgG en comparación con los controles (42% vs 23%, $p = 0.06$). Franceschi y cols (28) encontraron que *H. pylori* Cag-A se asoció significativamente con síndrome coronario agudo (OR = 1,34; IC 95%: 1,15-1,58, $p = 0.0003$). También se ha demostrado que la infección por *H. pylori* se asoció con ECA temprana en individuos sin factores de riesgo clásicos o convencionales (29). Otro estudio interesante fue el que realizó Assadi y cols, en donde evidenciaron la asociación entre *H. pylori* y la angina de pecho en pacientes con arterias epicárdicas sanas (30).

CONCLUSIÓN

La hipótesis infecciosa de la aterosclerosis ha sido uno de los principales temas de investigación a nivel mundial en las últimas décadas. Los resultados no han sido reproducibles en su totalidad y en consecuencia no son concluyentes entre algunos trabajos y otros. Al parecer por tratarse de una patología compleja y multifactorial los resultados son discordantes entre una población y otra. Por lo tanto, más estudios son necesarios para poder concluir de manera más precisa la participación de patógenos infecciosos en la génesis de la aterosclerosis.

Agradecimientos

El presente artículo de investigación es un producto del proyecto de investigación titulado "Identificación de la Carga Infecciosa, Cuantificación de citoquinas proinflamatorias y Caracterización de lesiones ateroscleróticas; en pacientes que acuden al servicio de cirugía cardiovascular pertenecientes a la red hospitalaria del Departamento del Atlántico durante los años 2016–2017". Financiado por el Sistema General de Regalías del Departamento del Atlántico a través del programa de CT+I EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN TODO EL DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO – BPIN 2014000100039. OBJETIVO 2 – ACTIVIDAD 06 DEL PROGRAMA. CONVENIO NÚMERO 0103*2015*000031.

REFERENCIAS

- 1.DANE lista 6/667 CIE 10 de OPS. Estadísticas Vitales 2009. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/.../Lista667_OPS.xls
- 2.Ministerio de Salud y Protección Social. Indicadores Básicos Situación de Salud en Colombia 2011. <https://www.minsalud.gov.co/salud/.../indicadoresbasicosp.aspx>

3. Análisis de situación de salud del distrito de barranquilla año 2016. www.barranquilla.gov.co/salud/index.php/informes/doc_download/198-
4. Libby P., Bornfeldt KE., Tall AR. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges. *Circ Res* 2016; 118:531-4.
5. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, Takx RAP, Brown AJ, Tawakol A, Fayad ZA, Rudd JHF. Imaging atherosclerosis. *Circ Res.* 2016; 118:750 –769. doi: 10.1161/CIRCRESA-HA.115.306247.
6. Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res.* 2016; 118:620–636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
7. R. Ross, *N. Engl. J. Med.* 340. Atherosclerosis an inflammatory disease (1999)115-126.
8. P. Libby, G. Pasterkamp. Requiem for the 'vulnerable plaque', *Eur. Heart J.* 36(43) (2015 Nov 14) 2984-2987, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv349>.
9. Mozaffarian D., Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics – 2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2016;133(4): e38-e360.
10. E. Falk, M. Nakano, J.F. Bentzon, et al., Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view, *Eur. Heart J.* 34 (2013) 719-728.
11. Anderson, J. L., and Morrow, D.A. Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2017; 376:2053-64. DOI: 10.1056/NEJMra1606915.
12. Langhorne P., Fearon P., Ronning OM., Kaste M, Palomaki H., Vemmos K., et al. Stroke unit care benefits patients with intracerebral hemorrhage: systematic review and meta-analysis. *Stroke.* 2013;44(11):3044-9.
13. Laslett LJ., Alagona P. Jr., Clark BA., Drozda JP. Jr., Saldivar F., Wilson SR., et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60:S1-S49.
14. Tsivgoulis G., Safouris A., Kim DE., and Alexandro AV. Recent Advances in Primary and Secondary Prevention of Atherosclerotic Stroke. *J Stroke.* 2018 May; 20(2): 145–166. doi: [10.5853/jos.2018.00773]
15. Campbell LA., and Rosenfeld ME. Infection and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res.* 2015 Jul; 46(5): 339–350. doi:[10.1016/j.arcmed.2015.05.006]
16. Pothineni NVK., Subramany S., Kuriakose K., Shirazi LF., Romeo F., Shah PK., Mehta JL. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Eur Heart J.* 2017;38:3195–3201.

doi: 10.1093/eurheartj/ehx362

17. Shana J., Baib X., Han L., Yuan Y., Yang J. and Sun X. Association between atherosclerosis and gastric biomarkers concerning *Helicobacter pylori* infection in a Chinese healthy population. *Experimental Gerontology* 2018;112: 97–102.
18. Kountouras J., Polyzos SA, Katsinelos P, Zeglinas C, Artemaki F, Tzivras D, et al. Cardio-cerebrovascular disease and *Helicobacter pylori*-related metabolic syndrome: We consider eradication therapy as a potential cardio-cerebrovascular prevention strategy. *Int J. Cardiol.* 2017; 229: 17–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.11.265> PMID: 27887801
19. Sun J., Rangan P., Bhat SS., Liu L. A Meta-Analysis of the Association between *Helicobacter pylori* Infection and Risk of Coronary Heart Disease from Published Prospective Studies. *Helicobacter.* 2016; 21:11–23. <https://doi.org/10.1111/hel.12234> PMID: 25997465
20. García A., Contreras, J. 2010. Estandarización de una técnica de PCR anidada para la detección de *Helicobacter pylori*. Tesis de grado Universidad de Pamplona.
21. Blaser MJ., Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *JCI.* 2004; 113:321-33.
22. Goodman KJ., Joyce SL., Ismond KP. Extragastric diseases associated with *Helicobacter pylori* infection. *Current Gastroenterology Reports.* 2006; 8:458-64.
23. Budzynski J., Kozinski M., Klopocka M. et al. Clinical significance of *Helicobacter pylori* infection in patients with acute coronary syndromes: an overview of current evidence. *Clin Res Cardiol* 2014; 103:855 – 86.
24. Coskun S., Kasirga E., Yilmaz O., Bayindir P., Akil I., Yuksel H., Polat M., Sanlidag T. Is *Helicobacter pylori* related to endothelial dysfunction during childhood? *Pediatr Int* 2008; 50: 150-153 [PMID:18353048 DOI: 10.1111/j.1442-200X.2008.02542.x]
25. Ayada K., Yokota K., Kobayashi K., Shoenfeld Y., Matsuura E., Oguma K. Chronic infections and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1108: 594±602. PMID: 17894024
26. Pellicano R., Mazzarello MG., Morelloni S., Allegri M., Arena V., Ferrari M., Rizzetto M, Ponzetto A. Acute myocardial infarction and *Helicobacter pylori* seropositivity. *Int J Clin Lab Res* 1999; 29:141-144 [PMID: 10784374 DOI: 10.1007/s005990050080]
27. Vijayvergiya R., Agarwal N., Bahl A., Grover A., Singh M, Sharma M., Khullar M. Association of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* infection with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2006; 107: 428-429 [PMID: 16503271 DOI:10.1016/j.ijcard.2005.02.028]
28. Franceschi F., Niccoli G., Ferrante G., Gasbarrini A., Baldi A., Candelli M., Feroce F., Saulnier N., Conte M., Roccarina D., Lanza GA., Gasbarrini G., Gentiloni SN., Crea F. CagA antigen of *Helicobacter pylori* and coronary instability: insight from a clinico-pathological study and a meta-analysis of 4241 cases. *Atherosclerosis* 2009; 202:535-542 [PMID: 18599062 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.04.051]

29. Goyal P., Kalek SC., Chaudhry R., Chauhan S., Shah N. Association of common chronic infections with coronary artery disease in patients without any conventional risk factors. *Indian J Med Res* 2007; 125: 129-136 [PMID: 17431281]

30. Assadi M., Saghari M., Ebrahimi A., Reza Pourbehi M., Eftekhari M., Nabipour I., Abbaszadeh M., Nazarahari M., Nasiri M., Assadi S. The relation between *Helicobacter pylori* infection and cardiac síndrome X: a preliminary study. *Int J Cardiol* 2009; 134: e124-e125 [PMID: 18501447 DOI: 10.1016/j.ijcard.2008.01.029]