

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Scienze Chirurgiche Oncologiche e
Gastroenterologiche

Direttore: Prof. Fabio Farinati

TESI DI LAUREA

Gastrite atrofica autoimmune: ruolo dei microRNA
in relazione all'infezione da H. pylori

Relatore: **Prof. Fabio Farinati**

Correlatrice: **Dott.ssa Fabiana Zingone**

Laureando: **Eugenio Collesei**

Anno Accademico 2021-2022

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1. EPIDEMIOLOGIA	6
2. EZIOPATOGENESI	8
2.1 Genetica	8
2.2 Infezione da H. pylori	8
3. PRESENTAZIONE CLINICA	10
3.1 Disturbi gastrointestinali	10
3.2 Disturbi ematologici	10
▪ 3.2.1 Anemia da carenza di vitamina B12 (o perniciososa)	10
▪ 3.2.2 Anemia sideropenica	11
▪ 3.2.3 Trombosi correlata all'iperomocisteinemia	12
3.3. Disordini neuropatici	12
4. DIAGNOSI	13
4.1. Sierologia	13
▪ 4.1.1 Parietal Cells Antibodies (PCA)	13
▪ 4.1.2 Intrinsic Factor Antibodies (IFA)	13
▪ 4.1.3 PG I/PG II e Gastrina-17	14
▪ 4.1.4 Cromogranina A	14
4.2 Endoscopia	15
4.3 Istologia	16
▪ 4.3.1 Prima fase	17
▪ 4.3.2 Seconda fase (florida)	17
▪ Terza fase (avanzata)	18
5. COMORBIDITÀ	20
5.1 Altre patologie autoimmuni	20
5.2 Tumori neuroendocrini gastrici di tipo 1 (g-NEN di tipo 1)	20

5.3 Polipi iperplastici	21
5.4 Adenocarcinoma gastrico	21
▪ 5.4.1 Classificazione OLGA	21
▪ 5.4.2 Operative Link on Gastritis Intestinal Metaplasia (OLGIM) ...	22
▪ 5.4.3 Management of Precancerous conditions and lesions in the Stomach (MAPS II)	22
6. TERAPIA	24
6.1 Supplementazione micronutrienti	24
▪ 6.1.1 Vitamina B12	24
▪ 6.1.2 Ferro	25
6.2 Eradicazione H. pylori	25
6.3 Trattamento del carcinoide gastrico di tipo 1 o g-NEN di tipo 1.....	26
7. MICRO-RNA (miRNA)	27
7.1 Effetto patogenico dei miRNA	27
▪ 7.1.1 Patologie autoimmunitarie	28
▪ 7.1.2 Tumori	28
▪ 7.1.3 Ruolo nella patogenesi gastrica	29
7.2 miR-21	29
7.3 miR-142	29
7.4 miR-155	30
7.5 miR-223	30
SCOPO DELLO STUDIO.....	31
MATERIALI E METODI.....	33
RISULTATI	37
1. Caratteristiche demografiche della popolazione studiata	37
2. Parametri bioumorali	38
3. Comorbidità autoimmunitarie	39
4. Complicanze neoplastiche	40
5. CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE	41
5.1 Confronto GAI primaria vs GAI HP/atrofia antrale	41

5.2 Confronto GAI vs GAM	43
6. miRNA	45
DISCUSSIONE	49
BIBLIOGRAFIA	55

RIASSUNTO

Introduzione. La gastrite autoimmune (GAI) è un disordine infiammatorio, cronico ed immunomediato dello stomaco caratterizzato da progressiva atrofia della mucosa ossintica. Sebbene la sua esatta eziopatogenesi non sia ancora perfettamente conosciuta, negli ultimi anni è stato dimostrato un ruolo rilevante dell'infezione da *H. pylori*. Nonostante diagnosi e follow-up dei pazienti GAI siano principalmente di tipo endoscopico/istologico, recenti studi hanno evidenziato come l'analisi dell'espressione dei miRNA, ed in particolare di miR-223, miR-21, miR-155 e miR-142, possa rivestire un ruolo di rilievo come fattore diagnostico, come biomarker di progressione neoplastica e, potenzialmente, come bersaglio terapeutico.

Scopo dello studio. Nel presente studio ci si è posti l'obiettivo di confrontare pazienti affetti da GAI HP-relata (diagnosi istologica di GAI e pregressa storia di HP/atrofia antrale) con pazienti affetti da GAI primaria (diagnosi istologica di GAI senza storia di HP/atrofia antrale). In particolare, sono state analizzate: caratteristiche clinico-demografiche/biumorali/istologiche e l'eventuale associazione con altre patologie autoimmuni o con complicanze neoplastiche. Successivamente, è stato valutato il profilo di espressione di alcuni miRNA (miR21, miR142, miR223, miR155) in pazienti affetti da GAI (primaria o HP-relata), in pazienti affetti da gastrite atrofica multifocale non autoimmune (GAM) e in controlli sani in modo da evidenziare eventuali differenze di espressione.

Materiali e metodi. Sono stati reclutati nello studio 103 pazienti affetti da GAI sottoposti ad EGDS tra gennaio 2011 ed aprile 2021 presso il Servizio di Endoscopia Digestiva dell'UOC di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova. I pazienti reclutati sono stati suddivisi in due gruppi: GAI primarie (n=57) e GAI HP-relata/atrofia antrale (n=46). Per ciascun paziente sono stati quindi raccolti dati anagrafici, anamnestici e biumorali mediante consultazione delle cartelle cliniche. Successivamente, ogni paziente è stato sottoposto ad EGDS di controllo con mappatura biptica. Infine, sono stati dosati i livelli circolanti di miR21-5p (oncogene), miR142-3p (oncosoppressore), miR223-3p (oncogene), miR155-5p (oncogene ed oncosoppressore).

Successivamente è stato impostato un analogo confronto tra pazienti affetti da GAI, pazienti con diagnosi di GAM (n=20) e controlli sani (n=8).

Risultati. I due gruppi di pazienti GAI risultano simili per caratteristiche anagrafiche, bioumorali, anamnestiche e da un punto di vista del danno istopatologico. Le differenze diventano più evidenti quando vengono confrontati il gruppo dei pazienti GAI con quello dei pazienti GAM: dal punto di vista della stadiazione OLGA, i primi risultano appartenere maggiormente al primo ed al secondo stadio, mentre i secondi raggiungono anche il quarto stadio. Interessante da menzionare è quanto emerso dall'analisi dei miRNA: miR-21, che è oncogene, risulta maggiormente espresso nei gruppi GAI primaria (p=0.024), GAI HP/aa (p<0.001) e GAM (p=0.039) rispetto ai controlli sani; miR-142, con attività di oncosoppressore, risulta iperespresso nei controlli sani (vs GAI primaria p=0.059; vs GAI-HP/AA p=0.034; vs GAM p=0.021); miR-155, appartenente al gruppo sia degli oncogeni che degli oncosoppressori, non presenta differenze significative tra i 4 gruppi; miR-223 (oncogene) risulta overespresso nei controlli sani (vs GAI primarie, p=0.012; vs GAI HP/atrofia antrale, p=0.005; vs GAM, p=0.001) e maggiormente espresso nelle GAI primarie rispetto alle GAM (p=0.022).

Conclusioni. Molteplici sono le pathways cellulari controllate a livello post-genomico dai miRNA, ma la modulazione dell'espressione dei miRNA potrebbe rappresentare una rivoluzione nel controllo della storia naturale delle lesioni gastriche atrofiche nei soggetti affetti. Un tale sviluppo potrebbe aprire nuovi scenari diagnostico-terapeutici nell'ambito delle gastriti atrofiche e delle altre lesioni coinvolte nella cascata di Correa, come metaplasia intestinale/SPEM o nelle lesioni displastiche: infatti, il controllo dell'espressione genica dei miRNA potrebbe aiutare nel follow-up delle lesioni gastriche nei pazienti affetti da gastrite atrofica, identificando i soggetti affetti a maggior rischio di progressione di malattia o addirittura facendo sì che il quadro istopatologico di questi soggetti possa non peggiorare e in alcuni casi anche regredire, se si riuscirà a modulare in senso positivo o negativo l'espressione e l'attività dei miRNA coinvolti nel processo come oncogeni o oncosoppressori.

ABSTRACT

Introduction. Autoimmune gastritis (AAG) is an inflammatory, chronic, and immune-mediated disorder of the stomach characterised by progressive atrophy of the oxyntic mucosa. While the exact etiopathogenesis has not been fully elucidated, a relevant role of *H. pylori* infection has been demonstrated in recent years. Although diagnosis and follow-up of AAG patients is mainly performed endoscopically/histologically, recent studies have shown that the analysis of miRNA expression, in particular miR-223, miR-21, miR-155, and miR-142, may play an important role as diagnostic markers, biomarkers of neoplastic progression, and possibly therapeutic targets.

Aim of the study. The aim of this study was to compare patients with HP -related AAG (histological diagnosis of AAG and previous history of HP /antral atrophy) with patients with primary AAG (histological diagnosis of AAG without history of HP /antral atrophy). In particular, the clinical/demographic/biohumoral/histological features and the possible association with other autoimmune diseases or neoplastic complications were investigated. Subsequently, the expression profile of some miRNAs (miR21, miR142, miR223, miR155) in patients with AAG (primary or HP -related), in patients with non-autoimmune multifocal atrophic gastritis (MAG) and in healthy control subjects was investigated to detect any differences in expression.

Materials and methods. A total of 103 patients with AAG who underwent EGDS between January 2011 and April 2021 in the Digestive Endoscopy Unit of the UOC of Gastroenterology of the University Hospital of Padua were recruited for the study. Participating patients were divided into two groups: primary AAG (n=57) and HP -related AAG/antral atrophy (n=46). For each patient, anagraphic, anamnestic, and biohumoral data were obtained by consulting the medical records. Subsequently, EGDS with biopsy was performed in each patient. Finally, circulating levels of miR21-5p (oncogene), miR142-3p (oncosuppressor gene), miR223-3p (oncogene), and miR155-5p (oncogene and oncosuppressor gene) were measured. Later, a similar comparison was made between patients with AAG, patients diagnosed with MAG (n=20), and healthy controls (n=8).

Results. The two groups of AAG patients are similar in age, biohumoral, anamnestic, and histopathologic characteristics. The differences become more

evident when comparing the group of AAG patients with the group of MAG patients: from the point of view of OLGA staging, the former belong rather to the first and second stages, while the latter also reach the fourth stage. It is interesting to mention what emerged from the analysis of miRNAs: miR-21, which is an oncogene, is more expressed in the primary AAG ($p=0.024$), AAG HP /aa ($p<0.001$) and MAG ($p=0.039$) than in healthy controls; miR-142, with oncosuppressive activity, is overexpressed in healthy controls (vs primary GAI $p=0.059$; vs GAI-HP /AA $p=0.034$; vs GAM $p=0.021$); miR-155, which belongs to both the oncogene and oncosuppressor groups, shows no significant differences between the 4 groups; miR-223 (oncogene) is overexpressed in healthy controls (vs primary AAG, $p=0.012$; vs AAG HP/antral atrophy, $p=0.005$; vs MAG, $p=0.001$) and more strongly expressed in primary AAG than in MAG ($p=0.022$).

Conclusions. There are several cellular pathways controlled at the post-genomic level by miRNAs, but modulation of miRNA expression may represent a breakthrough in controlling the natural history of atrophic gastric lesions in affected individuals. This development could open new diagnostic and therapeutic scenarios for atrophic gastritis and other lesions involved in the Correa cascade, such as intestinal metaplasia/SPEM or dysplastic lesions: indeed, control of miRNA gene expression could help in the follow-up of gastric lesions in patients with atrophic gastritis, identify affected individuals at higher risk of disease progression, or even ensure that the histopathological picture of these individuals does not worsen and in some cases even regresses, whether the expression and activity of miRNAs involved in the process as oncogenes or oncosuppressors can be modulated in a positive or negative direction.

INTRODUZIONE

La gastrite autoimmune (GAI), o gastrite di tipo A, è un disordine infiammatorio cronico, immunomediato, dello stomaco che colpisce la mucosa ossintica (o parietale) portando ad una sua progressiva atrofia. L'infiammazione è limitata alle ghiandole del corpo-fondo gastrico, il che permette di distinguere la GAI da altre gastriti atrofiche, come quella associata all'infezione da *Helicobacter pylori* che colpisce anche l'antrum gastrico.

Le cellule ossintiche sono cellule epiteliali localizzate nelle ghiandole del corpo e del fondo gastrico (Figura 1) deputate alla produzione di acido cloridrico e di fattore intrinseco, una glicoproteina che lega la vitamina B12 (1).

L'atrofia delle cellule parietali comporta la perdita del fattore intrinseco e la riduzione della secrezione acida che è normalmente regolata dalla pompa protonica H⁺/K⁺/ATPasi. Queste alterazioni risultano in un malassorbimento di ferro, vitamina B12 e altri micronutrienti (2).

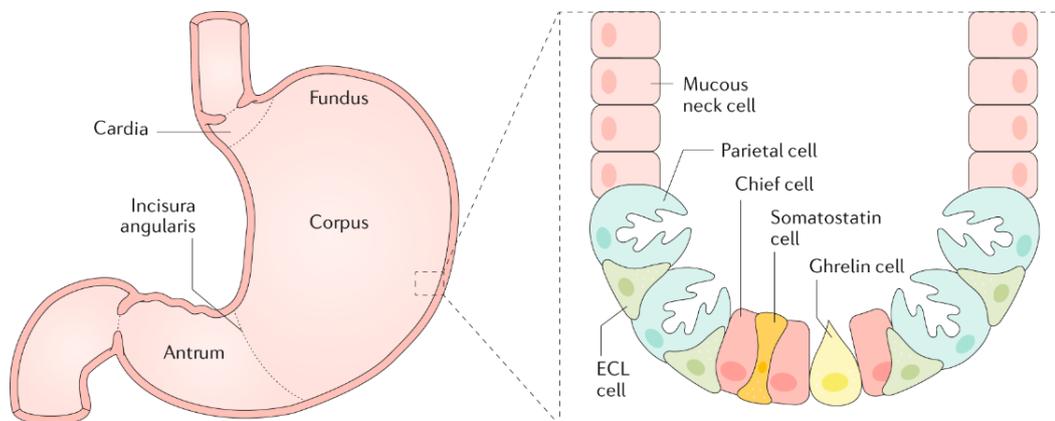


Figura 1: Anatomia dello stomaco, Lenti et al., *Nature reviews disease primers*, 2020

La gastrite autoimmune risulta essere più frequente nel sesso femminile, come altri disordini autoimmunitari e si riscontra più frequentemente in pazienti con altre patologie autoimmuni concomitanti, tra queste, la tiroidite di Hashimoto, il diabete mellito di tipo I, il morbo di Addison, la celiachia, la miastenia gravis, la vitiligine ed il lichen planus erosivo orale (3).

1. EPIDEMIOLOGIA

Nella popolazione generale la prevalenza della gastrite autoimmune è stimata tra il 2 e il 5% (4–6) con un'incidenza non quantificabile ma in apparente aumento nelle popolazioni occidentali (7). In particolare, dallo studio condotto in Italia da Miceli et al. nel 2012 emerge come la GAI abbia una prevalenza in Italia pari al 4.3%: considerando un campione di 2286 pazienti consecutivi dal 2007 al 2010 alla prima visita ambulatoriale gastroenterologica, 99 hanno ricevuto diagnosi di GAI sia tramite sierologia che istologia (5). Queste stime possono però essere ampiamente condizionate dal contesto epidemiologico, dalle comorbidità e dalla selezione del paziente (8). Diversi studi hanno infatti evidenziato come tali dati possano in realtà rappresentare una sottostima, correlata con tutta probabilità alla comune presenza della malattia nel suo stato asintomatico/paucisintomatico e alla mancanza di un efficace metodo di screening (2). Bisogna inoltre considerare come spesso i segni e i sintomi legati alla GAI non vengano immediatamente ricondotti alla patologia stessa: l'anemia perniciosa, per esempio, pur essendo il segno clinico più facilmente riconoscibile nella GAI, è spesso trattata senza investigarne l'origine, con conseguente ritardo diagnostico della patologia di base (2,8).

Analogamente ad altre patologie autoimmuni, anche la GAI si manifesta principalmente nel sesso femminile con un rapporto F:M pari a 2-3:1 (3–5,9). Alcuni studi hanno inoltre evidenziato come la patologia appaia essere più comunemente riscontrata in soggetti adulti, con età media alla diagnosi superiore ai 50-60 anni (2,8,10). Uno studio svedese del 2015 ha osservato però una crescita di incidenza della GAI tra i 35 e i 44 anni (11). Tali riscontri potrebbero non indicare una reale maggior frequenza della patologia in soggetti di età adulta, ma semplicemente essere il risultato del frequente ritardo diagnostico già citato in precedenza (5). Inoltre, il maggior riscontro della patologia in soggetti con età superiore ai 50-60 anni può anche essere dovuto alla scarsità di studi che valutino la GAI in popolazioni pediatriche.

Per quanto concerne la distribuzione geografica della gastrite autoimmune, sono stati condotti diversi studi aventi lo scopo di evidenziare eventuali differenze di incidenza e prevalenza in base all'etnia. Da uno studio retrospettivo cinese emergerebbe una incidenza dello 0.9%, evidenziando una possibile maggior

frequenza della GAI nei paesi occidentali rispetto a quelli orientali (12). Tale dato verrebbe confermato dallo studio di Notsu et al. del 2019, nel quale viene riscontrata un'incidenza dello 0.49% nella popolazione giapponese (13). Uno studio americano ha dimostrato una maggior prevalenza della GAI nelle donne di etnia ispanica e afro-americana rispetto alla popolazione caucasica (14). In conclusione, in virtù della difficoltà di valutazione epidemiologica della GAI, risulta comunque difficile ipotizzare differenze di prevalenza su base geografico-etnica.

2. EZIOPATOGENESI

L'eziologia e l'ordine esatto degli eventi che concorrono alla patogenesi della GAI non sono ancora perfettamente conosciuti. A livello patogenetico l'infiammazione della mucosa parietale e la sua progressione verso l'atrofia sono il risultato di una complessa interazione fra autoanticorpi diretti contro la pompa protonica $H^+/K^+/ATPasi$ e contro il fattore intrinseco (15). La causa di questo processo autoimmunitario è attribuibile sia a fattori di tipo genetico che a fattori di tipo ambientale (9).

2.1 Genetica

La genetica rappresenta un aspetto di notevole importanza nella gastropatia autoimmune. In particolare, lo studio del 2019 di Lenti et al. ha dimostrato una maggior prevalenza (16.5%) della GAI in soggetti con parenti di primo grado affetti dalla stessa patologia (16). Al contempo, sono stati individuati molteplici aplotipi HLA che parrebbero associati allo sviluppo della gastropatia autoimmune. Tra questi, come evidenziato dallo studio italiano di Lahner et al. del 2010, vi sono HLA-DRB1*03 e HLA-DRB1*04. Al contrario, lo stesso studio dimostra come l'aplotipo HLA-DRB1*01 risulti associato prevalentemente ad individui sani (17). Nello studio finlandese di Oksanen et al. del 2010 viene inoltre evidenziato un terzo aplotipo associato alla GAI: HLA-DQB1*03. In particolare esso si è dimostrato frequentemente legato a pazienti affetti dalla gastrite autoimmune HLA-DRB1*04 positivi (18).

2.2 Infezione da H. pylori

Il ruolo dell'infezione da *Helicobacter pylori* nella GAI rimane attualmente ancora incerto. Tuttavia, uno studio di Negrini et al. ha dimostrato la cross-reattività fra gli anticorpi indotti da *H. pylori* e quelli prodotti verso la mucosa parietale gastrica (19). Questo meccanismo, chiamato "mimetismo molecolare", rappresenta una reazione crociata tra gli antigeni dell'*H. pylori* e la pompa protonica $H^+/K^+/ATPasi$ (8,9) attribuibile all'elevata omologia fra la subunità beta dell'ureasi di *H. pylori* e quella della pompa protonica (20).

A supporto di quanto detto sopra, diversi studi hanno provato il ruolo di *H. pylori* nell'eziopatogenesi della GAI. Lo studio di Lahner et al. del 2017, per esempio, ha riscontrato la positività per i Parietal Cells Antibodies (PCA), tipicamente presenti nella GAI, anche nella gastrite atrofica multifocale da *H. pylori*, suggerendo dunque una correlazione tra le due condizioni patologiche (21). A supporto di questa associazione, lo studio di Annibale et al. rileva la presenza dell'infezione da *H. pylori* in pazienti affetti da GAI (22), mentre Bergman et al. hanno evidenziato come nell'83% dei pazienti affetti da GAI vi sia la presenza di anticorpi contro *H. pylori* (23).

È comunque importante da ricordare come la gastrite autoimmune sia riscontrabile anche in pazienti *Helicobacter pylori*-naïve (7) e come molto spesso in questi soggetti la diagnosi di GAI possa essere confusa con una infezione refrattaria da *H. pylori*. Tale concetto viene ampiamente dimostrato dal lavoro di Furuta et al. del 2018: tra i 404 pazienti in terapia per infezione da *H. pylori* reclutati nello studio, ben 43 hanno successivamente ricevuto nuova diagnosi di GAI. Il motivo di questa errata diagnosi di *H. pylori* è rappresentato dal fatto che gli anticorpi anti-cellule parietali (PCA) provocano acloridria e ciò permette a batteri ureasi-positivi diversi da *H. pylori*, come la *Klebsiella pneumoniae*, di colonizzare la mucosa gastrica. Conseguentemente il ¹³C-urea breath test, comunemente utilizzato per individuare *H. pylori*, risulta positivo comportando una diagnosi errata. Infatti, dei 43 pazienti con successiva diagnosi di GAI, 40 avevano ricevuto il trattamento di eradicazione per *H. pylori* con multipli fallimenti terapeutici (24).

3. PRESENTAZIONE CLINICA

Dal punto di vista clinico la GAI è una patologia silente, poiché insorge per lo più in modo asintomatico o paucisintomatico. La sintomatologia clinica associata compare, infatti, tardivamente e risulta per lo più di tipo ematologico, gastroenterico e neuropsichiatrico. Le manifestazioni ematologiche e gastroenterologiche sono le più frequenti: in particolare, quelle ematologiche sono spesso le prime ad essere riscontrate e la loro individuazione spesso permette di porre le basi per un'indagine più approfondita per GAI (6).

3.1 Disturbi gastrointestinali

I sintomi di natura gastroenterologica affliggono fino al 50-60% dei pazienti affetti da GAI. Tra questi, la dispepsia è il sintomo clinico maggiormente riscontrabile: uno studio di Carabotti et al. dimostra infatti come il 60% dei pazienti con gastrite autoimmune lamenti dispepsia (25). Uno studio di Kalkan et al., basato su un campione di 165 pazienti affetti da GAI, dimostra che nell'80% dei casi la sindrome dispeptica è associata a ritardato svuotamento gastrico, probabilmente dovuto a disordini della motilità dell'antro o all'ipergastrinemia che stimola la contrazione dell'antro stesso (26).

Diversi studi evidenziano come in questi pazienti possa essere riscontrata anche una sintomatologia simile a quella presente nella malattia da reflusso gastro-esofageo (MRGE): il bruciore di stomaco ed il rigurgito sono infatti presenti rispettivamente nel 24% e nel 12% dei pazienti affetti da GAI (5,25). Il rigurgito, rilevato grazie alla pH-impedenzometria esofagea, è però, a differenza di quello presente nella MRGE, di tipo non acido come dimostrato nello studio di Tenca et al. del 2016 (27).

3.2 Disturbi ematologici

3.2.1 Anemia da carenza di vitamina B12 (o anemia perniziosa)

La vitamina B12 ha un ruolo fondamentale in diversi processi metabolici, il più importante dei quali è la conversione dell'omocisteina in metionina. Una sua carenza comporterebbe un effetto negativo sulla sintesi del DNA e conseguentemente sulla formazione della linea eritrocitaria, portando ad

eritropoiesi inefficace e ad anemia megaloblastica ($MCV > 90$ fL). Tale anemia, che si riscontra nel 54-62% dei pazienti affetti da GAI, si manifesta con una serie di sintomi come astenia, fatica, vertigini, ipotensione e tachicardia compensatoria. La carenza di VitB12 può inoltre provocare una alterazione del normale colorito cutaneo: al pallore tipico presente nel paziente anemico si associa, infatti, un colorito giallognolo della cute dovuto ad un fenomeno di emolisi intramidollare che porta ad un rialzo della bilirubina nel sangue.

Segno patognomico dell'anemia perniziosa è la glossite atrofica di Hunter (Figura 2), che rende la lingua secca, liscia e di un colore rosso cremisi. I pazienti lamentano una sensazione di bruciore sulla punta della lingua ed è visibile il segno della dentatura sulle superfici laterali (9,28,29).



Figura 2: Glossite di Hunter

3.2.2 Anemia sideropenica

L'anemia sideropenica è riscontrata nel 52% dei pazienti affetti da GAI. Nella maggior parte dei casi precede l'insorgenza dell'anemia da carenza di vitamina B12, diventando così la prima manifestazione ematologica clinicamente riscontrabile nei pazienti affetti da gastrite autoimmune (9).

Alla base dell'anemia da carenza di ferro vi sono diversi fattori: il sanguinamento occulto cronico dovuto a microerosioni gastriche (14), l'eventuale competizione con *H. pylori* per il ferro introdotto con la dieta (30), l'ipocloridria (31) e l'up-regolazione dell'epcidina infiammatoria (25).

3.2.3 Trombosi correlata all'iperomocisteinemia

La carenza di vitamina B12, anche in stadi precoci di malattia, comporta iperomocisteinemia proporzionalmente alla severità della deficienza di B12. L'elevata concentrazione di omocisteina nel sangue è riconosciuta come un fattore di rischio per malattie cardiovascolari e gioca un ruolo importante nello sviluppo di demenza, diabete mellito e insufficienza renale. Comunque, il significato clinico dell'iperomocisteinemia e la sua associazione con una patologia del sistema cardiovascolare deve ancora essere valutata nei pazienti affetti da GAI (29).

3.3 Disordini neuropatici

Oltre all'anemia, un'altra conseguenza dell'insufficienza di vitamina B12, micronutriente fondamentale per la sintesi delle guaine mieliniche e delle terminazioni nervose, è la neuropatia. Il danno specifico al sistema nervoso è detto "mielosi funicolare" ed ha un ventaglio di sintomi molto ampio: la più comune manifestazione (25% dei casi) è la polineuropatia periferica sensitivo-motoria che comporta intorpidimento e formicolio di mani e piedi. Meno frequentemente (1-2%) si possono riscontrare paraparesi spastica, atassia sensoriale, disordini urinari e riflessi extrapiramidali alterati (28).

La carenza di vitamina B12 è quindi causa sia di disordini ematologici che neurologici i quali, come dimostrato dallo studio di Yang et al., possono essere presenti indipendentemente gli uni dagli altri e non necessariamente in concomitanza (32).

4. DIAGNOSI

È già stato descritto in precedenza come la GAI sia una condizione silente e paucisintomatica e come questo vada a determinarne una notevole difficoltà diagnostica. Per tale motivo nelle ultime due decadi si è diffuso un sempre crescente livello di attenzione in merito all'analisi clinica (ampiamente discussa nel capitolo precedente), laboratoriale ed istopatologica della malattia. È proprio la combinazione di queste caratteristiche a permettere la diagnosi finale di GAI.

4.1 Sierologia

Durante l'iter diagnostico della gastrite autoimmune diversi marker sierologici, indicati nella Tabella 1, vengono titolati per poter selezionare i pazienti che necessitano di conferma biotica per giungere alla diagnosi certa di GAI.

4.1.1 Parietal Cells Antibodies (PCA)

Gli anticorpi contro le cellule parietali sono positivi nell'85-90% dei pazienti affetti da GAI. L'esame possiede ottima sensibilità, ma scarsa specificità poiché tali anticorpi possono essere riscontrati anche in altre patologie autoimmuni, come il diabete mellito di tipo I e la tiroidite di Hashimoto (33).

L'identificazione dei PCA può essere effettuata tramite immunofluorescenza o metodo ELISA, quest'ultimo gode di un 30% di sensibilità in più rispetto all'altro (15).

I livelli nel sangue degli anticorpi contro le cellule parietali possono modificarsi nel corso della storia naturale della GAI: la progressiva distruzione della mucosa gastrica e la conseguente perdita del target auto-antigenico possono infatti portare alla progressiva riduzione dei PCA nelle fasi tardive di malattia, fino addirittura alla loro negativizzazione (15).

4.1.2 Intrinsic Factor Antibodies (IFA)

Gli anticorpi contro il fattore intrinseco di Castle risultano essere più specifici dei PCA (98.6%), ma con una sensibilità significativamente inferiore (60%) (31,34). Uno studio di Antico et al. ha dimostrato che comunque la positività agli anticorpi

anti-fattore intrinseco possiede una buona correlazione con la progressione atrofica della mucosa gastrica (35).

4.1.3 PG I/PG II e Gastrina-17

Pepsinogeno I (PG I), Pepsinogeno II (PG II) e Gastrina-17 sono dei valori laboratoriali che vengono dosati mediante il Gastropanel, esame definito anche “biopsia sierologica” poiché pone una base significativa per l’ipotesi diagnostica di GAI. (36,37). L’atrofia della mucosa gastrica e la perdita di attività delle cellule parietali del corpo gastrico portano ad ipocloridria/acloridria, con conseguente aumento di gastrina-17, per l’iperplasia delle cellule secretorie dell’antro, riduzione di PG I, prodotto dalle cellule del corpo, e riduzione del rapporto PG I/PG II. A differenza del PG I, infatti, il PG II, essendo prodotto dalle cellule antrali, non riduce il proprio valore (15,29).

È stato dimostrato che la riduzione del pepsinogeno I sotto ai 30 µg/L e del rapporto PG I/PG II sotto al 3, in combinazione con l’aumento della gastrina-17 sopra le 30 pmol/L, aiuta l’identificazione dei pazienti affetti da GAI durante lo stadio asintomatico (38). In particolare, la sensibilità raggiunge il 74.5% e la specificità è addirittura del 100% (29).

4.1.4 Cromogranina A

Il valore della Cromogranina A (CgA), il cui andamento correla con il livello di iperplasia delle cellule enterocromaffini-simili (ECL), può essere considerato un marker ausiliare per stabilire il rischio di insorgenza di tumori neuroendocrini (NET) spesso associati a GAI (39).

Il suo utilizzo nella pratica di routine viene però limitato dalla sua bassa sensibilità e specificità: il rialzo sierologico della CgA può essere infatti evidenziato anche in pazienti con IBD (Inflammatory Bowel Disease), carcinoma epatocellulare, NAFLD, insufficienza renale e utilizzo di PPI a lungo termine. Per questo motivo affinché un suo aumento abbia significato clinico deve essere integrato agli altri valori di laboratorio, al contesto clinico ed a quello istopatologico (40,41).

Indice di laboratorio	Andamento
Anticorpi contro le cellule parietali	↑
Anticorpi contro il fattore intrinseco	↑
Pepsinogeno I	↓
Pepsinogeno II	Invariato
Pepsinogeno I/Pepsinogeno II	↓
Gastrina-17	↑
Cromogranina A	↑
Vitamina B12	↓

Tabella 1: Indici di laboratorio dosabili nella GAI

4.2 Endoscopia

L'indagine endoscopica viene eseguita con lo scopo di ottenere dei prelievi biotici del tessuto gastrico sui quali procedere con l'analisi istopatologica (10).

Nei pazienti affetti da GAI, l'aspetto della mucosa gastrica evidenziata durante la procedura è variabile in base allo stadio della malattia stessa: nella forma iniziale la mucosa può essere indistinguibile da quella di un paziente sano, mentre negli stadi più avanzati possono essere visibili *flattened rugal folds* (le normali rugae o pliche gastriche risultano appiattite comportando un'alterata fisiologia gastrica), vasi sottomucosi (Figura 3) e pseudopolipi/polipi iperplastici o adenomatosi (Figura 4) (42).



Figura 3: Visione endoscopica di vasi sottomucosi nel fondo gastrico di una GAI, Massironi et al., *Science direct*, 2019



Figura 4: Visione endoscopica di polipi nel fondo gastrico di una GAI, Massironi et al., *Science direct*, 2019

Il recente progresso tecnico della procedura endoscopica ha permesso non solo un miglioramento della qualità d'immagine della mucosa gastrica, ma anche il raggiungimento di una migliore capacità di prelievo biotico (10).

La sola endoscopia non permette però di raggiungere diagnosi di certezza di GAI: nonostante la sua evoluzione negli anni e lo sviluppo di nuove tecnologie, sensibilità e specificità rimangono basse. Ciò nonostante, l'endoscopia rimane tutt'ora un ottimo strumento mediante il quale il clinico può porre forte sospetto di GAI a seguito del riscontro di alcune anomalie caratteristiche della mucosa (42).

4.3 Istologia

L'analisi istologica del campione biotico acquisito mediante indagine endoscopica costituisce il gold standard per la diagnosi di GAI.

Secondo le raccomandazioni aggiornate di Sydney, a scopo diagnostico dovrebbero essere ottenuti 5 campioni biotici: 2 dal corpo, 2 dall'antro e una dall'incisura angularis (8,43).

La progressione delle anomalie istologiche indotte dalla malattia può essere suddivisa in 3 fasi evolutive.

4.3.1 Prima fase

Nello stadio iniziale di malattia è presente un'infiltrazione diffusa della lamina propria della mucosa da parte dei linfociti e delle plasmacellule, associata ad una miscela di mastociti (mast cells) ed eosinofili (Figura 5). È caratteristica anche la presenza di un'iperplasia delle cellule parietali che riflette l'ipergastrinemia tipica della GAI (9,29).

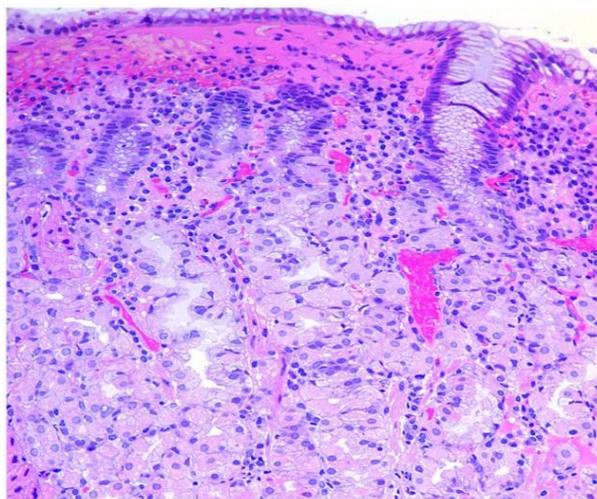


Figura 5: Infiltrato infiammatorio linfoplasmatico della lamina propria del fondo gastrico, Livzan et al., *Diagnostics*, 2021

4.3.2 Seconda fase (florida)

È sempre presente un denso infiltrato della lamina propria come nella prima fase e sono chiaramente visibili le alterazioni atrofiche delle ghiandole (Figura 6):

- Metaplasia intestinale (IM): sostituzione delle cellule parietali con un epitelio muco-secrente fenotipicamente simile a quello delle cellule intestinali (9).
- Spasmolytic Polypeptide-Expressing metaplasia (SPEM): è una metaplasia pseudo-pilorica detta anche “antralizzazione ossintica”, che risulta essere associata ad un maggiore rischio di insorgenza di tumore intestinal-type nel paziente con GAI (29).

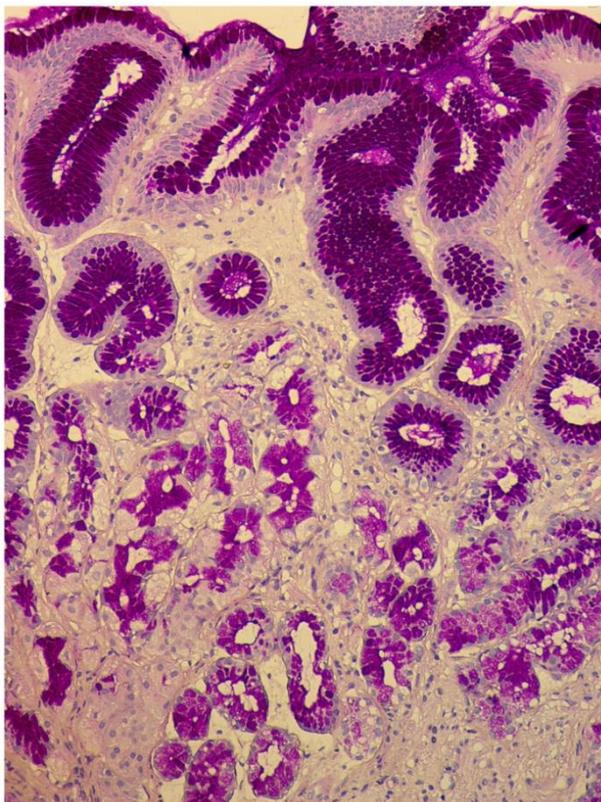


Figura 6: Biopsia del corpo gastrico con severa metaplasia pseudopilorica, Livzan et al., *Diagnostics*, 2021

4.3.3 Terza fase (avanzata)

Nell'ultima fase di malattia la GAI è caratterizzata, come evidente nella Figura 7, da:

- proliferazione delle cellule neuroendocrine ECL del corpo gastrico;
- desertificazione della mucosa ossintica, ovvero la sostituzione delle ghiandole parietali con la fibrosi della lamina propria;
- iperplasia foveolare, con una variazione microcistica sottostante (underlying microcistic change);
- formazione di polipi iperplastici;
- incremento di zone metaplastiche intestinali, pancreatiche e pseudo-piloriche (9,29).

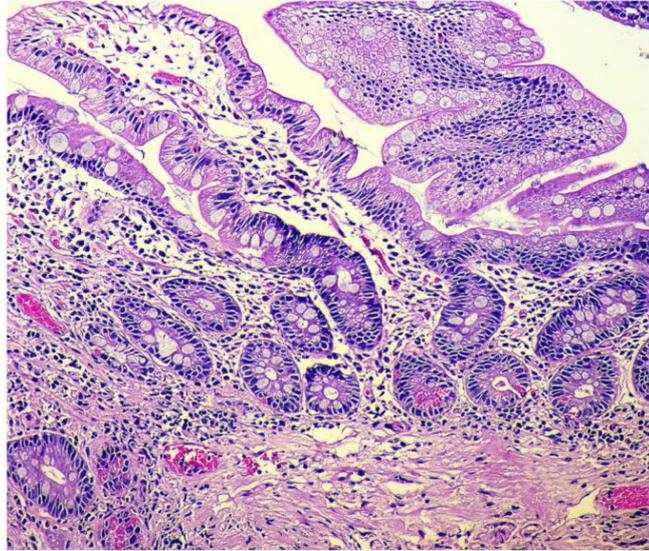


Figura 7: Severa metaplasia intestinale con intestinalizzazione della mucosa gastrica del corpo,
Livzan et al., *Diagnostics*, 2021

5. COMORBIDITÀ

5.1 Altre patologie autoimmuni

È noto come nei pazienti affetti da GAI, proprio in virtù dell'origine autoimmune della patologia stessa, vi sia un rischio 3-5 volte maggiore di sviluppare altre patologie autoimmuni rispetto alla popolazione generale. Tra queste possono essere citate la tiroidite autoimmune, il diabete mellito di tipo I (44), la vitiligine (45), il morbo di Addison (46), la miastenia gravis (47) e il lichen planus erosivo. Uno studio di Kalkan et al. ha reclutato una coorte di 320 pazienti affetti da GAI, osservando in 53% soggetti patologie autoimmuni concomitanti, multiple nell'11% dei casi (48).

L'associazione più comune è con la tiroidite di Hashimoto, con una prevalenza che arriva anche al 45% nei pazienti più anziani (49). Alla base di tale connessione potrebbe esserci l'origine embrionaria comune fra le cellule della mucosa gastrica e le cellule follicolari: entrambe infatti originano dall'endoderma (6).

Il diabete mellito di tipo 1 (DM1) è il secondo disordine autoimmunitario più frequente nei pazienti con la GAI. Tale associazione è avvalorata da uno studio di De Block et al. che osserva la presenza dei PCA nel 15-25% dei pazienti affetti da DM1 arruolati per lo studio (44).

5.2 Tumori neuroendocrini gastrici di tipo 1 (g-NEN di tipo 1)

I NET sono dei tumori rari, molto differenziati e con un indice proliferativo basso. Sono principalmente suddivisibili in 3 tipi: tipo 1 (atrofia predominante del corpo), tipo 2 (associato a gastrinoma e sindrome MEN-1), tipo 3 (sporadico).

Questi tumori hanno una buona prognosi, con sopravvivenza stimata a 5 anni del 95% ed a 10 anni del 74% (29,50).

I tumori neuroendocrini più frequenti nei pazienti con GAI sono quelli di tipo 1.

Da un punto di vista patogenico, l'ipocloridria gastrica presente nei pazienti con GAI in fase avanzata favorisce lo sviluppo dei NET stimolando la secrezione di gastrina da parte delle cellule G dell'antro e la conseguente proliferazione delle cellule enterocromaffini-simili (ECL) (8).

I NET nel paziente affetto da GAI (g-NEN di tipo 1) insorgono con un'incidenza che varia dal 0.4% al 7% (9,51) e sono spesso piccoli (<1cm di diametro), multipli ed endoscopicamente si presentano come polipi sessili.

5.3 Polipi iperplastici

I polipi iperplastici sono proliferazioni meta-infiammatorie delle cellule foveolari gastriche. Nei soggetti affetti da GAI i polipi sono spesso multipli e localizzati prossimalmente. Inoltre, possono presentare delle micro-erosioni superficiali che comportano delle perdite croniche di sangue contribuendo all'anemia sideropenica. Infine, i polipi iperplastici sono più numerosi nella gastrite autoimmune rispetto ad altre forme di gastrite (8,9).

5.4 Adenocarcinoma gastrico

L'adenocarcinoma gastrico (ADK gastrico) è una delle complicanze neoplastiche che possono insorgere nel paziente affetto da GAI. La gastrite atrofica tipica della GAI è infatti considerata una lesione precancerosa (8). L'incidenza di questo tumore maligno nei soggetti con gastrite autoimmune può variare dallo 0 all'1.8% (9). La percentuale di atrofia della mucosa gastrica è direttamente proporzionale al rischio di sviluppare adenocarcinoma gastrico: in particolare, un rischio maggiore è riscontrato nei soggetti con vasta presenza di metaplasia intestinale (29).

Proprio per tale motivo sono stati studiati ed elaborati dei sistemi di prevenzione, che permettano di seguire il comportamento neoplastico delle lesioni atrofiche presenti nella GAI e di compiere una miglior sorveglianza endoscopica in questi soggetti.

5.4.1 Classificazione OLGA

Nel 2005 lo studio di Rugge et al. ha proposto un sistema di stratificazione del rischio di insorgenza di adenocarcinoma gastrico basato sull'analisi istologica della mucosa gastrica: l'Operative Link on Gastritis Assessment (OLGA) (52).

Il punteggio OLGA, come evidenziato dalla Tabella 2, prende in considerazione l'atrofia sia del corpo che dell'antro attribuendo un punteggio che varia da 0 a 3, calcolato sulla base della percentuale di tessuto atrofico rilevato all'esame istologico (2).

		CORPUS			
		No atrophy (score 0)	Mild atrophy (score 1)	Moderate atrophy (score 2)	Severe atrophy (score 3)
A N T R U M	No atrophy (score 0) (including incisura angularis)	STAGE 0	STAGE I	STAGE II	STAGE III
	Mild atrophy (score 1) (including incisura angularis)	STAGE I	STAGE II	STAGE II	STAGE III
	Moderate atrophy (score 2) (including incisura angularis)	STAGE II	STAGE II	STAGE III	STAGE IV
	Severe atrophy (score 3) (including incisura angularis)	STAGE III	STAGE III	STAGE IV	STAGE IV

Tabella 2: Stadiazione OLGA, Rugge et al., *Science direct*, 2005

Nella GAI questo sistema è utilizzato per valutare la progressione della patologia e fornisce informazioni importanti sul rischio di carcinoma gastrico. Uno studio di Rugge et al. del 2012 afferma che il rischio tumorale è fino a 5-6 volte maggiore rispetto alla popolazione generale nei pazienti con uno stadio OLGA III/IV ed in particolare in quelli con concomitante infezione da H. pylori (7,9,29).

5.4.2 Operative Link on Gastritis Intestinal Metaplasia (OLGIM)

La classificazione OLGIM si basa sulla presenza della sola metaplasia intestinale, ignorando quindi altre caratteristiche istologiche tipiche della GAI. Per questo motivo OLGIM deve essere integrato dallo score OLGA per ottenere una miglior stadiazione ed un miglior inquadramento del paziente: il solo utilizzo di OLGIM porterebbe infatti ad un down-staging della GAI (8).

5.4.3 Management of Precancerous conditions and lesions in the Stomach (MAPS II)

Le ultime linee guide in merito alla sorveglianza endoscopica nei pazienti affetti da GAI raccomandano un follow-up ogni 3-5 anni. La ricorrenza del follow-up nei pazienti GAI, comunque, dipende dalla stratificazione di questi nella stadiazione OLGA: infatti, negli score OLGA III e IV la sorveglianza endoscopica risulta essere ogni 2-3 anni (53).

Per determinare la fattibilità e l'utilità di un programma di sorveglianza endoscopica più stringente con lo scopo di individuare tumori gastrici GAI-associati nel loro stadio precoce, è stato valutato il rapporto costo-beneficio: uno studio del 2017 evidenzia come debbano essere eseguite 19 endoscopie di screening per poter individuare un solo tumore gastrico (54).

6. TERAPIA

Pur essendo una malattia con eziologia autoimmune, non è attualmente disponibile per il trattamento della GAI una terapia diretta (antiinfiammatoria, immunosoppressiva o biologica). Tuttavia, sono stati condotti diversi studi che cercano di individuare un farmaco diretto verso la componente autoimmune della patologia. Uno studio di Jorge et al. dimostra come l'azatioprina possieda un modesto effetto nel recupero della mucosa gastrica nei pazienti affetti da GAI (55). Al contrario, in uno studio dello stesso anno, viene dimostrato come il trattamento con prednisolone orale non porti ad alcun miglioramento significativo delle lesioni gastriche (56). Non sono presenti invece studi che riguardino anticorpi monoclonali diretti contro le citochine infiammatorie coinvolte nel processo patogenetico della GAI (2).

6.1 Supplementazione micronutrienti

Il trattamento principale nei pazienti affetti da GAI consiste nella supplementazione di micronutrienti: in particolare vitamina B12 e ferro.

6.1.1 Vitamina B12

La supplementazione della VitB12 permette la parziale regressione delle manifestazioni cliniche legate al deficit della vitamina stessa. Il miglioramento della sintomatologia neurologica dipende da severità e durata dei sintomi stessi (9), ma spesso tende a permanere nonostante la normalizzazione dei livelli di VitB12. I disturbi ematologici, invece, tendono più facilmente a regredire. In particolare, l'acido metilmalonico (MMA) e l'omocisteina ritornano ai livelli normali in 5 giorni-2 settimane, la cobalamina si normalizza dopo 2 settimane di trattamento e la macrocitosi scompare durante il primo mese di terapia. L'emoglobina, invece, impiega un po' più di tempo a stabilizzarsi (9).

Il trattamento del deficit di VitB12 nei pazienti con GAI dura per tutta la vita ed è principalmente preferita la somministrazione intramuscolare per permettere una rapida ed ottimale correzione di tale micronutriente. Esistono diverse formulazioni (idrossicobalamina, cianocobalamina o metilcobalamina (2)) ed il dosaggio è inizialmente di 3 volte a settimana per 2 settimane per permettere un rapido

riequilibrio dei valori alterati, poi si passa ad una somministrazione settimanale per 1-2 mesi e infine mensile (57,58).

Altra via di somministrazione possibile, seppur meno utilizzata, è quella orale, che però sembrerebbe meno efficace da un punto di vista terapeutico. Tale teoria viene però smentita da uno studio di Wang et al. che dimostra come l'efficacia della terapia orale di vitamina B12 sia comparabile a quella intramuscolare e di minor costo (59). Tuttavia, il trattamento orale richiede una buona compliance da parte del paziente ed un'elevata dose giornaliera, fattori che possono portare ad una mancata aderenza alla terapia da parte del paziente stesso. In ogni caso, i pazienti con una deficienza sintomatica di vitamina B12, specialmente se con sintomi neurologici, o con livelli criticamente bassi nel sangue dovrebbero essere sempre trattati per via intramuscolare (2,10,60). Nel caso di lieve atrofia gastrica, invece, può essere proposta anche la somministrazione orale con posologia varia da 500 a 1000 µg die (61).

La terza via di somministrazione è quella sublinguale. Nonostante gli studi a riguardo siano limitati, questo tipo di trattamento presenta diversi vantaggi, tra cui una buona sicurezza, una corretta aderenza del paziente e un costo ridotto. Infatti, la tecnica sublinguale permette ai pazienti con difficoltà di deglutizione o con problemi di malassorbimento intestinale di assorbire la vitamina B12 a livello dei capillari situati proprio nella zona sublinguale (62).

6.1.2 Ferro

La supplementazione di ferro può avvenire sia per via orale che per via endovenosa. Le due vie di somministrazione sono comparabili per efficacia nel trattamento dell'anemia sideropenica come evidenzia uno studio di non-inferiorità di Birgegård del 2016 (63). Nonostante l'efficacia delle due terapie sia simile, uno studio di Okam et al. dimostra come sia consigliabile uno switch verso la somministrazione intravenosa di ferro se un soggetto dopo un ciclo di 14 giorni di terapia orale presenta un'emoglobina diminuita di 1 g/dL (64).

6.2 Eradicazione H. pylori

L'infezione da H. pylori gioca un ruolo importante nella patogenesi della GAI, dunque è fondamentale indagarne la presenza e poi eventualmente iniziare una

terapia per la sua eradicazione. Il trattamento dell'infezione può far decrescere i livelli di anticorpi presenti nei pazienti affetti da GAI ed è stata provata la sua efficacia come terapia negli stadi precoci (65,66). Essendo la GAI una patologia tipicamente asintomatica in fase iniziale, è però difficile portare ad una completa guarigione della patologia stessa con la sola eradicazione dell'H. pylori.

6.3 Trattamento del carcinoide gastrico di tipo 1 o g-NEN di tipo 1

I carcinoidi gastrici di tipo 1, tumori benigni frequentemente associati alla GAI, hanno una prognosi eccellente. Per il loro trattamento sono state proposte diverse soluzioni, tra cui la mera sorveglianza, la polipectomia e l'antrectomia (viene rimossa la parte dello stomaco che produce la gastrina) (10,67).

Più di recente è stato introdotto un nuovo tipo di trattamento di questi tumori: il Netazepide, un antagonista del recettore della gastrina. In uno studio di Fossmark et al. l'utilizzo di questo farmaco ha portato ad un calo dei livelli di Cromogranina A nel sangue e ad una riduzione di numero e grandezza dei carcinoidi gastrici (68). Un'altra opzione da considerare per il trattamento dei NET è l'impiego degli analoghi della somatostatina: infatti in uno studio prospettico con 107 pazienti GAI, l'utilizzo del farmaco ha portato ad una riduzione della gastrina e della CgA (69). Una nuova ed emergente forma di trattamento dei NET consiste nella radioterapia recettoriale (PRRT). Questa nuova terapia però non ha ancora avuto riscontro prospettico in uno studio che coinvolga dei pazienti affetti da gastrite autoimmune (10,70).

7. MICRO-RNA (miRNA)

I microRNA (miRNA) sono molecole di RNA non codificante a singolo filamento costituite da 19-25 nucleotidi. Si stima vi siano addirittura più di 1000 tipi di miRNA codificati nel genoma umano (71).

Generalmente i miRNA vengono trascritti a partire da sequenze di DNA in pri-miRNA (miRNA primari) e poi processati in pre-miRNA (precursori miRNA) e, successivamente, in miRNA maturi.

La loro funzione principale è quella di inibire e destabilizzare l'RNA messaggero (mRNA): i micro-RNA, infatti, si legano mediante sequenze complementari agli mRNA portando ad una repressione della traduzione o ad una riduzione dell'emivita citoplasmatica dell'mRNA stesso. Tali sequenze di legame sono nella maggior parte dei casi rappresentate dalla regione 3'UTR dell'mRNA (72), ma uno studio di Broughton et al. del 2016 ha identificato altre regioni con le quali i miRNA possono interagire: la regione 5' UTR, la sequenza codificante, e i geni promotori (73). Oltre al silenziamento genico, è stato dimostrato come queste piccole molecole di RNA possano anche fungere da attivatori della trascrizione genica (74,75).

Riassumendo, un singolo filamento di miRNA, potendo legare centinaia di mRNA diversi, può influenzare l'espressione di altrettanti geni, sia con azione down-regolatoria che up-regolatoria (76).

7.1 Effetto patogenico dei miRNA

L'azione di soppressione/attivazione genica regolata dai miRNA può comportare delle anomalie a carico della normale fisiologia cellulare, con conseguente innesco di svariati processi patogenetici a livello sistemico: è stato infatti dimostrato come un'espressione aberrante di miRNA possa essere associata a diverse patologie, tra cui le più frequenti sono le patologie autoimmunitarie e i processi neoplastici (77). In aggiunta, essendo i miRNA secreti nei fluidi extracellulari (miRNA circolanti), possono essere utilizzati come marker nello studio dell'outcome clinico, nel monitoraggio e nella terapia di pazienti affetti dalle suddette patologie (74,77,78).

7.1.1 Patologie autoimmunitarie

Nell'ultima decade diversi studi hanno dimostrato l'associazione tra micro-RNA e patologie autoimmunitarie. Uno studio di Wang et al. del 2016 ha concluso come miR-21 abbia un ruolo di estrema rilevanza in questo contesto. MiR-21 infatti, promuove la differenziazione delle cellule Th17 che mediano l'attivazione della risposta autoimmunitaria (79). Il ruolo del miR-21 è stata anche oggetto di studio di una metanalisi di Zhang et al. del 2020 che ha analizzato l'espressione di vari miRNA in diverse patologie autoimmunitarie. In particolare, tale studio ha evidenziato come nel lupus eritematoso sistemico (LES) e nel DM1 vi sia una iperespressione di miR-21, il quale attiverebbe le cellule T e stimolerebbe di conseguenza la produzione di citochine. MiR-155, invece, altera la tolleranza immunitaria producendo autoanticorpi che distruggono le cellule pancreatiche nel DM1. Infine, miR-223 è iperespresso nell'artrite reumatoide (AR) e nel LES (80).

7.1.2 Tumori

Il controllo dell'espressione genica mediato dai miRNA risulta di estrema importanza anche nel processo di sviluppo neoplastico (81): il suo ruolo in quest'ambito è stato studiato per la prima volta nel 2002 da Calin et al. (82).

I miRNA possono funzionare sia da oncogeni (oncomiR) che da soppressori tumorali (oncosoppressori-miR). In aggiunta, uno stesso miRNA può agire sia da oncogene sia da oncosoppressore, poiché possono riconoscere diversi mRNA e, viceversa gli stessi mRNA possono essere riconosciuti da diversi miRNA.

Un esempio di questo dualismo e dell'estrema variabilità di azione dei miRNA è rappresentato da miR-221 e miR-222, che hanno sia una funzione oncogenica che oncosoppressoria. Uno studio di Garofalo et al. del 2012 indaga come la funzione oncogenica di questi due miRNA sia rappresentata dall'inibizione di soppressori tumorali, quali p57 e p27, comportando la formazione di vari tumori solidi (83). Al contrario, Felli et al. nel 2005 dimostrano come questi due miRNA colpiscano un oncogene, KIT, e ne inibiscano la funzione comportando una riduzione della crescita di blasti nel contesto della leucemia eritroblastica e agendo quindi come degli oncosoppressori (84).

7.1.3 Ruolo nella patogenesi gastrica

Negli ultimi anni è stato studiato come i miRNA possano avere un ruolo importante nel processo di infiammazione gastrica e nella progressione tumorale. Ne conseguono diversi studi atti alla valutazione della loro eventuale efficacia come biomarker diagnostici e neoplastici (85,86).

I micro-RNA maggiormente implicati nell'ambito della patogenesi gastrica sono miR-223, miR-21 e miR-155. In uno studio di Link et al. del 2018 è sottolineato come questi miRNA siano utili come biomarcatori dell'atrofia gastrica: in particolare, miR-21 è aumentato significativamente nell'atrofia antrale, mentre miR-155 e miR-223 sono maggiormente espressi in quella del corpo (87).

7.2 MiR-21

MiR-21 è uno degli oncogeni più studiati negli ultimi anni, in quanto una sua iperespressione comporta un aumento della proliferazione e dell'invasione neoplastica delle cellule tumorali. Più del 92% dei pazienti con diagnosi di carcinoma gastrico risulta avere un'aumentata espressione di miR-21 (86). Uno studio di Sun et al. del 2020 analizza come miR-21 possa essere utilizzato anche come marcatore prognostico della progressione tumorale gastrica, risultando essere maggiormente espresso in pazienti con carcinoma gastrico allo stadio IV (88).

MiR-21, oltre all'importante ruolo nella patogenesi tumorale, risulta essere iperespresso anche nell'infezione da *Helicobacter pylori*. In uno studio di Zhang et al. del 2008 si è supposto come nella cascata carcinogenetica gastrica, sostenuta da HP, miR-21 agisca da cofattore nello stimolo all'invasione e alla metastasi (86,89).

7.3 Mir-142

Il miRNA con principale funzione oncosoppressoria del tumore gastrico è miR-142. Lo studio di questo miRNA contestualmente alle neoplasie gastriche è abbastanza recente e a dimostrazione di ciò la sperimentazione scientifica in tale campo è cresciuta notevolmente negli ultimi tre anni. In particolare, la down-regolazione dell'espressione di miR-142 comporta un aumento della crescita tumorale gastrica. Tre studi cinesi dimostrano come l'ipoespressione di questo miRNA in un tumore gastrico ne favorisca l'inversione di proliferazione, metastasi ed invasione mesenchimale, caratteristiche fondamentali di una neoplasia (90-92).

7.4 MiR-155

Il ruolo di miR-155 è duplice: può agire sia come oncogene sia come oncosoppressore. MiR-155 è un esempio di quanto sia ampio il campo di studio dei miRNA, che legandosi a mRNA differenti possono indurre differenti risposte biologiche nella patogenesi di una malattia.

La funzione oncogenica di miR-155 risulta molto importante nella proliferazione e nell'invasione del tessuto tumorale gastrico. A sostegno di questa tesi, due studi cinesi del 2020 analizzano come miR-155 sia importante nella migrazione e proliferazione delle cellule neoplastiche nei tumori gastrici (93,94).

La funzione oncosoppressoria risulta meno rappresentata nella letteratura scientifica della controparte oncogenica, ma è interessante conoscere come l'azione dello stesso miRNA su target biologici diversi porti a scenari diametralmente opposti. Uno studio di Ma et al. del 2016 conclude come miR-155 sia ipoespresso nel tessuto tumorale gastrico rispetto a quello sano e come la sua espressione corredi in maniera inversa con la grandezza tumorale e lo stadio patologico (95). Uno studio di Li et al. del 2018 afferma che la down-regolazione di miR-155 porterebbe ad una proliferazione neoplastica e ad una ridotta sensibilità al cisplatino delle cellule tumorali (96).

7.5 MiR-223

Un altro miRNA fortemente coinvolto nel processo infiammatorio e tumorale gastrico è miR-223. Come visto per miR-21, anche miR-223 è implicato nell'infezione da *Helicobacter pylori*. Uno studio di Yang et al. del 2018 dimostra come miR-223 sia iperespresso nell'infezione da HP mediata da Cag-A. Quest'ultima risulta essere uno dei più importanti fattori di rischio per lo sviluppo di carcinoma gastrico (97). La sua utilità come biomarker tumorale per individuare soggetti con elevato rischio di progressione neoplastica è dimostrato in uno studio di Fassan et al. del 2017 che dimostra come miR-223 sia maggiormente espresso in pazienti affetti da gastrite atrofica di alto grado (OLGA III e IV), quindi in soggetti con un elevato rischio di sviluppare un tumore gastrico (98).

SCOPO DELLO STUDIO

Il presente lavoro rappresenta uno studio monocentrico retrospettivo svolto presso la UOC di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova e con la collaborazione del servizio di Anatomia Patologica.

In particolare, lo studio si pone i seguenti obiettivi:

- Confrontare pazienti con GAI HP-relata (diagnosi istologica di GAI e pregressa storia di HP/atrofia antrale) e pazienti con GAI primaria (diagnosi istologica di GAI senza storia di HP/atrofia antrale). In particolare, per ciascun gruppo di pazienti sono state analizzate le caratteristiche clinico-demografiche, il profilo bioumorale (emocromo, ferritina, vitamina B 12, APCA, IFA, PGI, PGII, gastrina totale, Cromogranina A), le caratteristiche istologiche, l'eventuale associazione con altre patologie autoimmuni e la prevalenza di complicanze neoplastiche;
- Valutare il profilo di espressione dei principali miRNA circolanti (miR-21, miR-142, miR-223, miR-155) nei due gruppi di pazienti;
- Evidenziare eventuali differenze di espressione dei suddetti miRNA tra i pazienti affetti da GAI primaria o HP-relata, i pazienti affetti da gastrite atrofica multifocale (GAM) non autoimmune e i controlli sani.

MATERIALI E METODI

Sono stati reclutati per lo studio, pazienti con diagnosi di GAI seguiti presso il nostro ambulatorio, e presenti nel nostro database, che si sono sottoposti tra gennaio 2011 ed aprile 2021 ad EGDS presso il Servizio di Endoscopia Digestiva dell'UOC di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova.

I pazienti reclutati sono stati suddivisi in due gruppi:

- GAI primarie: pazienti con diagnosi di GAI che non presentavano storia di infezione da HP attuale o pregressa e che non presentavano atrofia dell'antro alla valutazione istologica.
- GAI HP-relata/atrofia antrale: pazienti che presentavano anamnesi positiva per infezione da HP pregressa o attiva ed avvenuta eradicazione. La storia di infezione è stata verificata tramite ricerca nel database informatico E-health di test diagnostici di conferma (ricerca dell'antigene fecale di HP, Urea breath Test, IgG anti-HP, ricerca istologica) e tramite la somministrazione di questionari specifici riguardo ad una eventuale pregressa infezione da HP e relativa terapia eradicante. In questo gruppo di pazienti sono stati, inoltre, inclusi anche soggetti che alla valutazione istologica presentassero atrofia antrale (non prevalente rispetto a quella del corpo gastrico) in quanto interpretata come spia di una pregressa infezione da HP misconosciuta.

Criteri di esclusione dallo studio sono stati la presenza di un quadro di GAI "potenziale", ovvero pazienti con positività ad APCA e/o IFA ed infiltrato linfoplasmocitario corpo-predominante che non presentavano atrofia conclamata del corpo (OLGA 0), e la non disponibilità di dati istologici e biumorali completi, la mancata firma del consenso informato per l'inclusione nel database e per il prelievo di sangue.

Per ciascun paziente si è quindi proceduto a raccogliere dati anagrafici, anamnestici e biumorali (PG I, PG II, Gastrina, Cromogranina A, emoglobina, MCV, cobalamina, ferritina) relativi al momento di inclusione.

Ogni paziente è stato successivamente sottoposto ad EGDS di controllo con tempistiche adeguate al consueto programma di follow-up indicato dalle ultime linee guida MAPS II (53). In particolare, è stato eseguito un mappatura biptica secondo i criteri illustrati dall'Updated Sidney System (salvo controindicazioni come la presenza di abbondanti quantità di ingesti o parametri emocoagulativi non permissivi). Sono state quindi eseguite due biopsie del fondo dello stomaco, due dell'antro, una dell'angulus ed eventuali ulteriori biopsie sulle lesioni riscontrate (99). I campioni prelevati da antro e angulus sono stati raccolti in un unico contenitore separati quindi dal corpo gastrico. I campioni biptici sono quindi inviati al servizio di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera di Padova e analizzati da un anatomopatologo esperto nella determinazione dello stadio OLGA. In linea con quanto indicato dall'OLGA Staging System, ad antro e corpo è stato associato uno score in base al grado di atrofia: grado 0 (atrofia 0%), grado 1 (atrofia 1-30%), grado 2 (atrofia 31-60%), grado 3 (atrofia >60%). È stata valutata inoltre la presenza di metaplasia intestinale con un punteggio calcolato in base alla sua severità: 0 se assente (0%), 1 se lieve (1-30%), 2 se moderata (31-60%), 3 se severa (>60%). Infine, è stata indagata, mediante immunohistochimica per Cromogranina, la presenza di iperplasia delle cellule ECL. Quest'ultima è stata dunque stratificata come assente (grado 0), lineare (grado 1), micronodulare (grado 2), nodulare (grado 3), adenomatoide (grado 4) e carcinoide (grado 5) con attribuzione di uno score progressivo da 0 a 5.

Per ogni paziente è stata poi indagata la presenza di batteri con morfologia compatibile con HP mediante colorazione di Giemsa modificata.

Infine, è stata ricercata la possibile positività per alterazioni displastiche o neoplastiche nelle ulteriori lesioni riscontrate all'EGDS.

Ad ogni paziente incluso nello studio, prima dell'esecuzione della EGDS, è stato prelevato un campione di sangue intero per il dosaggio dei livelli circolanti di miR-21-5p, miR-142-3p, miR-223-3p, miR-155-5p. I pazienti che non hanno acconsentito al prelievo sono stati esclusi dallo studio.

Il campione di sangue intero è stato effettuato a digiuno in provetta con EDTA e centrifugato entro 30 minuti a 3000 giri per 15 minuti. I campioni di plasma sono stati conservati nella nostra sieroteca a -20°C fino al momento dell'uso. L'RNA

totale è stato estratto da 200 uL di plasma utilizzando il Kit di estrazione per siero/plasma (miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit - Qiagen). L'efficienza dell'estrazione è stata verificata mediante l'aggiunta di oligonucleotidi sintetici (UniSp2, UniSp4, UniSp5) alle concentrazioni raccomandate. La trascrizione inversa per la sintesi del cDNA è stata effettuata utilizzando il kit miRCURY LNA RT (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore. L'efficienza di tale procedura è stata, ancora una volta, valutata mediante l'aggiunta di oligonucleotidi sintetici (UniSp6). L'espressione dei miRNA è stata poi valutata mediante analisi qRT-PCR (miRCURY LNA miRNA PCR Assays and PCR Panels - Qiagen) secondo le istruzioni del produttore mediante un sistema PRISM 7900HT (Applied Biosystems) con miR-93-5p, miR-103a- 3p, miR-425-5p come controlli interni per la normalizzazione. Le condizioni per la qRT-PCR sono state le seguenti: 95° C per 2 min, seguite da 40 cicli di 95° C per 10 s e 56° C per 60 s. L'espressione relativa di ciascun miRNA è stata infine calcolata utilizzando il metodo 2-DDCt (fold change) con volontari sani come gruppo di controllo di riferimento per la normalizzazione.

Per lo scopo del nostro studio sono stati analizzati campioni di siero provenienti da 20 pazienti con diagnosi di GAM HP-relata e da 8 controlli sani sottoposti ad EGDS per dispepsia senza riscontri patologici, per cui era disponibile il consenso informato per l'inclusione allo studio, e dati clinici e bioumorali presenti nel nostro sistema informatico.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software STATA 11. La distribuzione dei parametri esaminati è stata verificata con test di Kolmogorov-Smirnov. Per l'analisi statistica delle variabili continue con distribuzione non parametrica è stato utilizzato il Mann-Whitney U test (MW), mentre per le variabili con distribuzione normale il T di Student per dati non appaiati. L'analisi delle variabili categoriche è stata eseguita mediante test Chi-quadrato o test di Fisher a seconda della numerosità.

I risultati sono stati considerati statisticamente significativi con $p < 0.05$.

Lo studio è stato autorizzato dal Comitato etico e dal Nucleo Ricerca clinica (numero di approvazione 3312/AO/14 prot. 0034435).

RISULTATI

Sono stati retrospettivamente valutati per lo studio 197 pazienti con diagnosi istologica di GAI, seguiti presso il nostro ambulatorio, e sottoposti ad EGDS nel periodo in esame (2011-2021).

Di questi, 94 sono stati esclusi per mancanza dei criteri di inclusione (dati incompleti, EGDS eseguita altrove, non disponibilità di sangue in sieroteca per mancata firma del consenso informato).

Sono quindi stati infine arruolati 103 pazienti con diagnosi di GAI, ulteriormente suddivisi in due gruppi: 57 appartenenti al gruppo GAI primarie e 46 appartenenti al gruppo GAI HP/atrofia antrale. Di quest'ultimo gruppo, 32 hanno avuto una storia pregressa di HP, 9 hanno atrofia antrale e 5 una storia pregressa di HP associata ad atrofia antrale.

Hanno inoltre preso parte allo studio 20 pazienti con diagnosi istologica di GAM e 8 controlli sani a scopo di confronto.

1. Caratteristiche demografiche della popolazione studiata

Le caratteristiche demografiche dei pazienti parte dello studio sono evidenziate nella Tabella 3.

	GAI totali (n 103)	GAI primaria (57/103)	GAI HP /atrofia antrale (46/103)	GAM (n 20)	Controlli sani (n 8)
Maschi , n (%)	24 (23%)	12 (21%)	12 (26%)	9 (45%)	3 (38%)
Femmine , n (%)	79 (77%)	45 (79%)	34 (74%)	11 (55%)	5 (62%)
Età , media + DS	58.5 ± 12	58 ± 11	61 ± 13	66 ± 10	42 ± 14

Tabella 3: caratteristiche demografiche di GAI (gastrite atrofica autoimmune) totali, GAI primaria, GAI HP (*Helicobacter pylori*)/atrofia antrale, GAM (gastrite atrofica multifocale) e controlli sani

Non sono emerse differenze statisticamente significative tra i pazienti GAI primaria e GAI HP/atrofia antrale.

Gli 8 controlli sani, invece, presentano un'età media significativamente più bassa rispetto ai pazienti GAM e ai pazienti affetti da GAI ($p < 0.001$).

Nessun paziente tra quelli considerati nello studio presentava infezione da HP attiva al momento della valutazione endoscopica e biumorale.

2. Parametri biumorali

I parametri biumorali analizzati nei pazienti GAI ed i dati relativi al confronto tra i pazienti con GAI primaria e GAI HP-relata/atrofia antrale sono mostrati in Tabella 4.

	GAI totali (n 103)	GAI primaria (n 57)	GAI HP /atrofia antrale (n 46)	p value
APCA, n (%)	88 (85%)	49 (86%)	39 (85%)	ns
IFA, n (%)	74 (72%)	40 (70%)	34 (74%)	ns
Emoglobina (v.n. 12.3 – 17.5 mg/dl)	13.2 (12.6-14)	13.2 (12.6-14.2)	14.1 (13.1-14.7)	0.007
MCV (80-96 fL)	89.5 (85-93)	87.4 (84.2-91.4)	89.7 (84.6-91.4)	ns
Ferritina (v.n. 14-233 ug/L)	25.5 (16-51)	25.5 (17-39)	26.5 (15.5-56)	ns
Vit. B12 (v.n. 180-900 ng/L)	325 (193.5 – 507)	345 (198-525)	352 (208-463)	ns
PG I (v.n. 20-110 ug/L)	7 (4 – 15.6)	6.2 (3.5-11)	9.9 (5-35.7)	0.038
PG II (v.n. 4-20 ug/L)	8 (6-10.6)	7.5 (6 – 9)	8.7 (6-12.4)	ns
PGI/PGII	0.93 (0.51-1.74)	0.83 (0.5-1.38)	1.45 (0.6-2.28)	ns
Gastrina (v.n. 11-54 pmol/L)	467 (298-950)	500 (304-1098)	454 (273-850)	ns
Cromogranina A (v.n. 0-98 ug/L)	155.5 (105 - 246)	163 (109-238)	145 (96-266)	ns

Tabella 4: parametri biumorali di GAI totali, GAI primaria, GAI HP/atrofia antrale

Le mediane dei valori di emoglobina, MCV, ferritina e vitamina B12 sono comprese nei limiti di norma, sebbene il valore dell'emoglobina sia risultato

statisticamente inferiore nei pazienti appartenenti al gruppo GAI primarie (p=0.007).

Le GAI primarie presentano inoltre valori di PGI più bassi rispetto ai pazienti GAI HP-relata/atrofia antrale (p=0.038). Tale dato si riflette anche su un rapporto PGI/PGII più basso nel primo gruppo senza però significatività statistica.

3. Comorbidità autoimmunitarie

Confrontando la presenza delle comorbidità autoimmunitarie più frequentemente associate alla GAI, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti. Le comorbidità maggiormente rappresentate sono la tiroidite di Hashimoto e la Sindrome Poliendocrina Autoimmune 3 (SPA3) (Tabella 5).

Presenza di comorbidità autoimmuni, n (%)	GAI totali (n 103)	GAI primaria (n 57)	GAI HP /atrofia antrale (n 46)	p value
Tiroidite di Hashimoto	35 (34%)	18 (32%)	17 (37%)	ns
SPA 3	35 (34%)	18 (32%)	17 (37%)	ns
Vitiligine	8 (8%)	6 (11%)	2 (4%)	ns
Psoriasi	8 (8%)	6 (11%)	2 (4%)	ns
Celiachia	7 (7.5%)	3 (5.5%)	4 (8%)	ns
Morbo di Basedow	6 (7%)	5 (9%)	1 (2%)	ns
Diabete Mellito Tipo1	1 (1%)	0 (0%)	1 (2%)	ns
Lichen Ruber Planus	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	ns

Tabella 5: comorbidità autoimmuni in GAI totali, GAI primaria, GAI HP/atrofia antrale

4. Complicanze neoplastiche

Prendendo in considerazione le complicanze neoplastiche, dallo studio emerge come al confronto tra i due gruppi di pazienti GAI fra loro e con i pazienti GAM non siano emerse differenze statisticamente significative (Tabella 6).

	GAI primaria (n 57)	GAI HP/atrofia antrale (n 46)	GAM (n 20)	p value
NET G1	3 (5%)	3 (7%)	0 (0%)	ns
AG	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	ns
HGD/LGD	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	ns

Tabella 6: complicanze neoplastiche in GAI primaria, GAI HP/atrofia antrale e GAM
NET, tumore neuroendocrino; AG, adenocarcinoma gastrico; HGD, displasia di alto grado; LGD, displasia di basso grado

L'unico caso di carcinoma gastrico riscontrato tra i 103 pazienti GAI è rappresentato da un uomo di 78 anni con diagnosi di adenocarcinoma di tipo intestinale dell'antro ben differenziato (G1, pT1a, N0) in un quadro di pangastrite atrofica (antro grado 1, corpo grado 3, stadio OLGA III). La diagnosi di adenocarcinoma è avvenuta a quattro anni dalla diagnosi di GAI. Il paziente al momento della diagnosi presentava storia di pregressa infezione da HP (eradicato 5 anni prima) e presentava già atrofia antrale (antro 1, corpo 2, stadio OLGA II).

5. CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE

5.1 Confronto GAI primaria vs GAI HP/atrofia antrale

Per quanto concerne l'analisi delle caratteristiche istologiche più frequentemente riscontrabili nei pazienti con diagnosi di GAI, è stato effettuato un confronto tra pazienti con GAI primaria e quelli con GAI HP/atrofia antrale.

		GAI primarie (n 57)	GAI HP/atrofia antrale (n 46)	p value
Atrofia del corpo	0	0 (0%)	0 (0%)	ns
	1	3 (5%)	6 (13%)	ns
	2	11 (19%)	7 (15%)	ns
	3	43 (53%)	33 (72%)	ns
Stadio OLGA	I	3 (5%)	6 (13%)	ns
	II	54 (95%)	27 (59%)	<0.001
	III	0 (0%)	13 (28%)	<0.001
	IV	0 (0%)	0 (0%)	ns

Tabella 7: Confronto delle caratteristiche istologiche nei pazienti con GAI primarie e con GAI HP/atrofia antrale

Analizzando il grado di atrofia del corpo gastrico non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti.

Prendendo in considerazione la stadiazione OLGA, emerge come lo stadio OLGA IV non risulti riscontrabile in nessuno dei pazienti GAI. Lo stadio OLGA III, invece, è stato individuato solo nei pazienti GAI HP/atrofia antrale ($p < 0.001$).

In nessuno dei due gruppi la ricerca di batteri con morfologia compatibile con HP all'istologia ha dato esito positivo.

Indagando la presenza di metaplasia intestinale ed il grado di iperplasia delle cellule ECL è emerso come queste presentino distribuzione simile nei due gruppi, senza alcuna significatività statistica (Tabella 8).

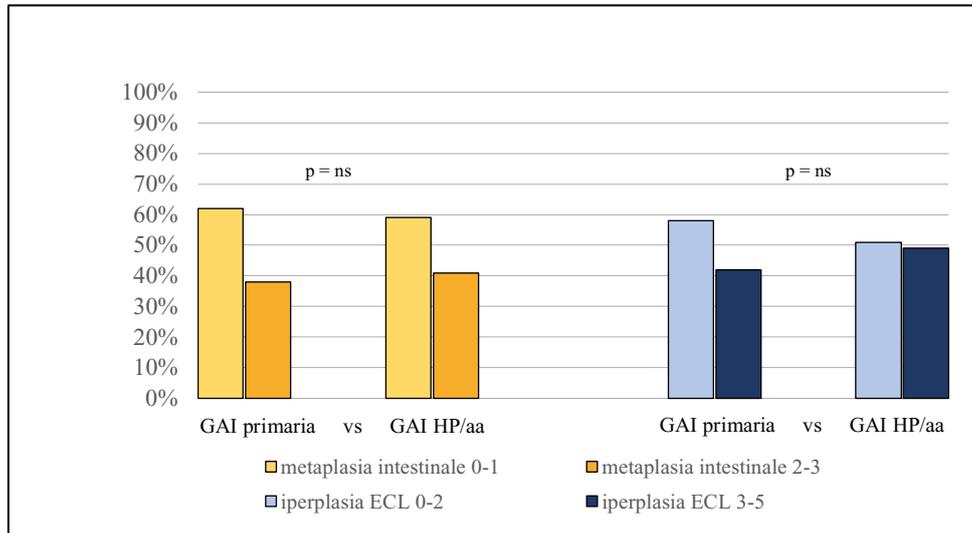


Tabella 8: distribuzione percentuale metaplasia intestinale ed iperplasia cellule ECL in pazienti con GAI primarie GAI HP/atrofia antrale

- *metaplasia intestinale 0-1: grado 0 (0%), grado 1 (1-30%); metaplasia intestinale 2-3: grado 2 (31-60%), grado 3 (>60%)*
- *iperplasia ECL 0-2: 0-assente, 1-lineare, 2-micronodulare; iperplasia ECL 3-5: 3-nodulare, 4-adenomatoide, 5-carcinoide*

5.2 Confronto GAI vs GAM

Analogamente a quanto descritto in precedenza, è stato anche effettuato un confronto tra le caratteristiche istologiche dei campioni biotici prelevati durante EGDS in pazienti affetti da GAI e in pazienti affetti da GAM.

		GAI (n 103)	GAM (n 20)	<i>p value</i>
Atrofia antrale	0	89 (86%)	0 (0%)	<0.001
	1	14 (14%)	2 (10%)	ns
	2	0 (0%)	16 (80%)	<0.001
	3	0 (0%)	2 (10%)	0.023
Atrofia del corpo	0	0 (0%)	9 (45%)	<0.001
	1	9 (9%)	7 (35%)	0.005
	2	18 (17%)	2 (10%)	ns
	3	76 (74%)	2 (10%)	<0.001
Stadio OLGA	I	9 (9%)	2 (10%)	ns
	II	81 (79%)	12 (60%)	ns
	III	13 (12%)	4 (20%)	ns
	IV	0 (0%)	2 (10%)	0.025

Tabella 9: Confronto delle caratteristiche istologiche nei pazienti con GAI e pazienti GAM

La presenza di atrofia antrale è risultata essere più comune nei pazienti con GAM rispetto a quelli con GAI, soprattutto per quanto riguarda gli stadi più avanzati di atrofia (grado 2 $p < 0.001$, grado 3 $p = 0.023$).

Per quanto riguarda l'atrofia del corpo, emerge come le forme di grado 0 e 1 siano significativamente più frequenti nella GAM (rispettivamente $p < 0.001$ e $p = 0.005$), mentre le forme di grado avanzato (grado 3) siano più comuni nella GAI ($p < 0.001$). Anche le forme di grado 2 sono risultate più frequenti nella GAI seppur senza significatività statistica.

Prendendo in considerazione la stadiazione OLGA, risulta come lo stadio IV sia riscontrabile solo nel gruppo GAM con $p = 0.025$.

Ancora una volta, in nessuno dei due gruppi la ricerca di batteri con morfologia compatibile con HP all'istologia ha dato esito positivo.

6. miRNA

I livelli dei miRNA considerati nello studio e dosati nel plasma dei pazienti con GAI, GAM e nei controlli sani sono riportati in tabella 10.

Il test di Kolmogorov-Smirnov ha dimostrato una distribuzione normale dei valori di miR-21-5p, miR-142-3p, miR-223-3p, mentre miR-155-5p presenta una distribuzione non normale.

	GAI primarie (57/103)	GAI HP /atrofia antrale (46/103)	GAM (n 20)	Controlli sani (n 8)
miR-21-5p[°]	1.95 ± 1.11	1.79 ± 1.03	1.87 ± 1.09	1.02 ± 0.21
miR-155-5p^{°°}	0.85 (0.5–1.56)	1.21 (0.66-2.04)	1 (0.25-2.3)	1.15 (0.70-1.55)
miR-142-3p[°]	0.77 ± 0.43	0.73 ± 0.40	0.67 ± 0.43	1.04 ± 0.31
miR-223-3p[°]	0.66 ± 0.40	0.60 ± 0.37	0.47 ± 0.26	1.04 ± 0.32

Tabella 10: Livelli di miRNA circolanti

[°]I valori sono riportati come media ± deviazione standard ^{°°}I valori sono riportati come mediana (25°-75° percentile)

Come evidenziato nel grafico sottostante (Figura 8), MiR21-5p è maggiormente espresso nei pazienti con GAI primaria, GAI HP/atrofia antrale e nei pazienti GAM rispetto ai controlli sani.

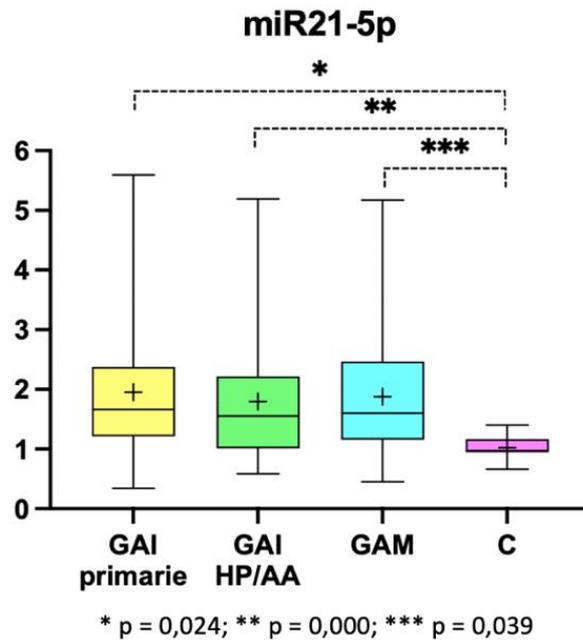


Figura 8: Livelli circolanti di miRNA-21-5p in GAI (Gastrite Autoimmune) primarie, GAI-HP (H. pylori)/AA (atrofia antrale), GAM (gastrite atrofica multifocale) e C (Controlli sani)

Dal grafico in Figura 9, invece, emerge come miR-142-3p presenti un comportamento diametralmente opposto, ovvero sia maggiormente espresso nei controlli sani rispetto agli altri tre gruppi di pazienti.

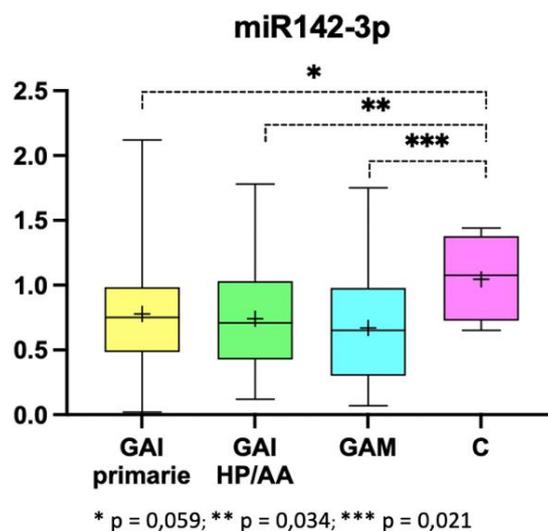


Figura 9: Livelli circolanti di miRNA-142-3p in GAI (Gastrite Autoimmune) primarie, GAI-HP (H. pylori)/AA (atrofia antrale), GAM (gastrite atrofica multifocale) e C (Controlli

I livelli circolanti di miR-155-p non sono risultati statisticamente differenti nei quattro gruppi di pazienti considerati dallo studio. Dal grafico sottostante (Figura 10) possiamo notare come i suoi valori abbiano una notevole varianza, raggiungendo i massimi valori di espressione nei pazienti GAI HP/atrofia antrale e nei pazienti GAM.

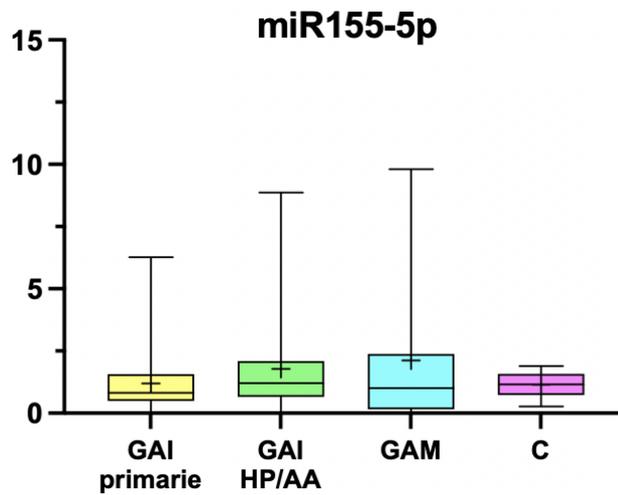
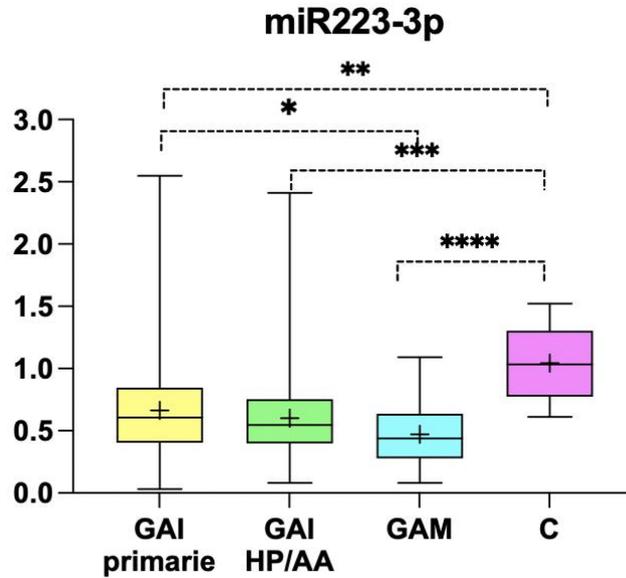


Figura 10: Livelli circolanti di miR-155-5p. GAI, Gastrite Autoimmune; HP, H. pylori; AA, atrofia antrale; GAM gastrite atrofica multifocale; C, Controlli sani

Infine, come evidenziato nella Figura 11, miR-223-3p risulta espresso con frequenza significativamente maggiore nei soggetti sani rispetto agli altri gruppi di pazienti. Presenta poi livelli progressivamente decrescenti in GAI primarie, GAI HP/atrofia antrale e nelle GAM con valori significativamente maggiori nelle GAI primarie rispetto alle GAM, $p = 0.022$.



* $p = 0.022$; ** $p = 0.012$; *** $p = 0.005$; **** $p = 0.001$

Figura 11: Livelli circolanti di miR-223-3p. GAI, Gastrite Autoimmune; HP, H. pylori; AA, atrofia antrale; GAM gastrite atrofica multifocale; C, Controlli sani

DISCUSSIONE

L'eziologia e l'ordine esatto degli eventi che concorrono alla patogenesi della GAI non sono ancora perfettamente conosciuti, sebbene nella più recente letteratura scientifica venga dimostrato come l'infezione da *Helicobacter pylori* rivesta un ruolo importante nell'innescare una reazione di cross-reattività tra gli anticorpi indotti dal batterio stesso e quelli prodotti verso la mucosa parietale gastrica.

Il presente studio si pone come scopo l'analisi di eventuali differenze tra pazienti affetti da GAI primaria e GAI HP/atrofia antrale da un punto di vista bioumorale, clinico e istologico, al fine di valutare il ruolo dell'infezione pregressa da HP nei pazienti affetti da gastrite autoimmune.

In aggiunta a questi due campioni di pazienti sono stati arruolati anche 20 soggetti con diagnosi istologica di GAM e 8 controlli sani. In particolare, sono state confrontate le caratteristiche istologiche e le complicanze neoplastiche con quelle del gruppo di pazienti GAI.

In ultima battuta, sono stati dosati i miRNA maggiormente correlati alla progressione infiammatoria e tumorale gastrica nei pazienti oggetto di studio (GAI primaria, GAI HP/atrofia antrale, GAM e controlli sani).

Dal punto di vista anagrafico i gruppi di pazienti studiati presentano caratteristiche simili, fatta eccezione per il gruppo dei controlli sani che presenta un'età media (42 anni) significativamente inferiore ($p < 0.001$) rispetto a quella degli altri gruppi (range 58.5-66 anni). Caratteristica interessante da evidenziare è la distribuzione della variabile sesso nei pazienti studiati: il genere femminile risulta rappresentare il 77% dei pazienti GAI, mentre nel gruppo di pazienti affetti da GAM e nei controlli sani il numero di maschi e di femmine risulta equamente distribuito. Questo dato riflette perfettamente la distribuzione epidemiologica per genere della gastrite autoimmune nella popolazione (F:M=3:1 (3-5,9)), dimostrando ancora una volta la maggior frequenza delle patologie autoimmuni proprio nel genere femminile.

Analizzando le caratteristiche biochimiche delle due sottopopolazioni GAI non sono emerse differenze statisticamente significative di rilievo, sebbene risulti una differenza per quanto concerne l'emoglobina ($p=0.007$). In ogni caso, nessuna riduzione patologica dell'emoglobina e dei valori di vitamina B12 è stata riscontrata

nel campione oggetto di studio, nonostante l'anemia da carenza di vitamina B12 rappresenti una delle presentazioni cliniche più frequente nei pazienti GAI. Alla luce di tale riscontro è ipotizzabile che la coorte di pazienti valutati sia già stata sottoposta a supplementazione vitaminica adeguata.

Altra significatività statistica interessante da osservare è quella riguardante PG I: il valore mediano risulta tipicamente ridotto nei pazienti GAI ma, in particolare, il nostro studio evidenzia valori significativamente più bassi nei soggetti con GAI primaria rispetto a quelli con GAI HP/atrofia antrale ($p=0.038$). Tale risultato potrebbe essere correlato ad un maggiore interessamento infiammatorio del corpo gastrico nei pazienti con GAI primaria, sebbene tale ipotesi non venga in realtà confermata dai dati in nostro possesso da cui risulta un grado avanzato di atrofia del corpo sia nei pazienti GAI HP/atrofia antrale (72%) che nei pazienti con GAI primaria (52%) senza differenze statisticamente significative.

È ormai noto come nei soggetti affetti da GAI, essendo questa una patologia di origine autoimmunitaria, vi sia una maggior probabilità di sviluppare altre patologie autoimmuni. Nel nostro campione di pazienti GAI la comorbidità più frequentemente riscontrata è la tiroidite di Hashimoto con una prevalenza del 34%. Tale dato conferma quanto già descritto da altri studi presenti in letteratura, nei quali la prevalenza di tale patologia può arrivare addirittura al 45% nei pazienti più anziani (49). Altre patologie autoimmuni presenti tra i 103 pazienti GAI arruolati nel presente studio sono: vitiligine (8%), psoriasi (8%), celiachia (7.5%), morbo di Basedow (7%), DM1 (1%), Lichen Ruber Planus (1%).

Altre comorbidità tipicamente associate a gastrite atrofica autoimmune sono quelle neoplastiche: in particolare i tumori neuroendocrini gastrici di tipo 1 e l'adenocarcinoma gastrico rappresentano le tipologie di tumori maggiormente correlate a GAI, con una prevalenza rispettivamente dello 0.4-7% e 0-1.8%. Tali dati vengono ampiamente confermati dal campione oggetto di studio: il NET gastrico di tipo 1 viene riscontrato in 6 pazienti su 103 (prevalenza 6%), mentre l'adenocarcinoma gastrico viene riscontrato solo in un caso (prevalenza 0.97%).

Analizzando le caratteristiche istologiche dei pazienti GAI, nel presente studio è stato eseguito un confronto tra GAI primaria e GAI HP/atrofia antrale che valutasse in particolare l'atrofia del corpo che risulta la caratteristica istologica maggiormente rappresentata nelle due sottopopolazioni. In particolare, l'atrofia del corpo di grado

3 risulta riscontrabile nel 53% dei pazienti con GAI primaria e nel 72% dei pazienti con GAI HP/atrofia antrale, senza differenze statisticamente significative.

Lo stadio OLGA, invece, rivela delle differenze significative tra i due gruppi. I pazienti affetti da GAI primaria possiedono per il 95% uno stadio OLGA II, mentre la controparte GAI HP/atrofia antrale si ferma al 59%. La differenza che risalta maggiormente però emerge soffermandosi sullo stadio OLGA III: questo risulta presente nello 0% dei pazienti affetti da GAI primaria e nel 28% di quelli con GAI HP/atrofia antrale. Tale risultato perde però di significatività scientifica nel momento in cui si valutano le caratteristiche istologiche dei pazienti, che potrebbero rappresentare un importante bias di selezione. Tra i 46 pazienti con GAI HP/atrofia antrale, infatti, ben 14 presentano un'atrofia antrale di grado 1 e, di questi, 13 risultano avere uno stadio OLGA III. Questo accade in quanto nel calcolo del punteggio OLGA vengono presi in considerazione il grado di atrofia del corpo e dell'antro gastrico; in particolare, i 13 pazienti sopracitati possedendo tutti un'atrofia dell'antro di grado 1 ed un'atrofia del corpo di grado III sono classificati nella fascia OLGA III, mentre il resto del gruppo GAI/HP atrofia antrale in quella OLGA II.

Andando ad analizzare la distribuzione della severità della metaplasia intestinale e dell'iperplasia delle cellule ECL non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi.

Successivamente, è stato effettuato anche un confronto tra le caratteristiche istologiche in pazienti affetti da GAI e in pazienti affetti da GAM. In questi ultimi l'atrofia maggiormente riscontrata è quella antrale di grado avanzato (grado 2 e 3 rispettivamente $p < 0.001$ e $p = 0.023$), invece quasi 3 pazienti GAI su 4 risultano avere un'atrofia avanzata del corpo di grado 3 ($p < 0.001$). Questi risultati sono perfettamente in linea con quanto viene espresso nella letteratura scientifica. Infatti, dal punto di vista della distribuzione quantitativa del campione, il 90% dei pazienti GAM afferisce al grado 2 e 3 dell'atrofia antrale (rispettivamente 80% e 10%), mentre il 91% dei pazienti GAI appartiene al grado 2 e 3 di atrofia del corpo gastrico (rispettivamente con il 17% e il 74%).

Per quanto concerne la stadiazione OLGA, la differenza statisticamente significativa più interessante da apprezzare è lo stadio OLGA IV che non risulta mai individuabile in pazienti affetti da GAI ma solo ed esclusivamente nei pazienti

affetti da GAM ($p=0.025$). Tale dato è dovuto al fatto che la GAI è una patologia atrofica limitata principalmente al corpo gastrico con uno sporadico, se non nullo, interessamento della zona antrale, attribuibile ad altre cause; nel nostro campione i pazienti GAI, quindi, non raggiungono mai lo stadio OLGA IV perché la maggior parte di loro possiede solo elevati gradi di atrofia del corpo senza un coinvolgimento avanzato dell'antro, comportando una classificazione di questi stessi pazienti nella fascia OLGA compresa fra lo stadio I e lo stadio III.

Accanto ad una valutazione delle differenze istologiche individuate tra i pazienti GAI primarie, GAI HP/atrofia antrale, GAM e controlli sani, è stata effettuata anche un'analisi dei livelli circolanti di quelli che negli ultimi anni sono risultati essere i miRNA principalmente correlabili alla patologia gastrica.

MiR-21 è uno dei miRNA maggiormente studiati negli ultimi anni e, come già descritto in precedenza, ha come ruolo principale quello di oncogene: la sua over espressione, infatti, è associata ad un aumento della proliferazione e dell'invasione neoplastica delle cellule tumorali.

Nel presente studio è stato riscontrato un aumento dei livelli circolanti di miR21-5p nei pazienti con GAI, sia primaria che HP/atrofia antrale, e con GAM rispetto ai controlli sani (rispettivamente $p = 0.024$, $p < 0.001$ e $p = 0.039$). Tale dato mette in risalto l'eventuale possibilità di utilizzare miR-21 come marker diagnostico di gastrite atrofica. Sebbene non analizzata nel presente studio, un'altra potenziale applicazione di miR-21, essendo questo iperespresso negli stadi avanzati di carcinoma gastrico, potrebbe essere quella di sfruttarlo come marcatore di progressione neoplastica.

Un comportamento contrario rispetto a miR-21 è stato riscontrato per miR-142: i suoi livelli di espressione, infatti, sono più elevati nei controlli sani se confrontati con quelli degli altri gruppi (controllo sano vs GAI primaria $p=0.059$, controllo sano vs GAI-HP/AA $p=0.034$, controllo sano vs GAM $p=0.021$). Sebbene la letteratura scientifica riguardante questo miRNA sia di recente acquisizione, diversi studi dimostrano come miR-142 funga da oncosoppressore nella patologia infiammatoria e tumorale gastrica. Nel presente studio, nonostante i pazienti GAM e GAI possiedano zone di atrofia gastrica differenti, i livelli nel siero di miR-142 non presentano differenze statisticamente significative; tale risultato è interessante,

perché prova come la diversa eziopatogenesi di GAI e GAM porti ad una pressoché uguale soppressione di questo miRNA.

Per quanto riguarda miR-155-5p, il suo ruolo risulta essere duplice (oncogene/oncosoppressore) evidenziando ancora una volta la vastità del campo di studio dei miRNA. L'espressione di miR-155-5p non si è dimostrata significativamente differente nei quattro gruppi presi in considerazione: valori più elevati, sebbene senza significatività statistica, risultano nei pazienti con GAI HP/atrofia antrale e nelle GAM. La natura dualistica di questo miRNA rende difficile una sua applicazione nel contesto della patologia gastrica: comportandosi sia da oncogene che da oncosoppressore potrebbe essere complicato proporre un suo utilizzo come marker prognostico nella progressione dell'atrofia gastrica.

L'ultimo miRNA analizzato è stato miR223-3p, il quale presenta livelli circolanti significativamente più elevati nei controlli sani rispetto agli altri gruppi (controlli sani vs GAI primarie, $p=0.012$; controlli sani vs GAI HP/atrofia antrale, $p=0.005$; controlli sani vs GAM, $p=0.001$). Tale risultato appare in contrasto con gli studi sinora pubblicati, in cui viene dimostrato come miR-223 sia aumentato nelle gastriti atrofiche e nel cancro gastrico (97,98). Nell'unico altro studio di analisi dei livelli sierici di miR-223, condotto da Aalami et al., la numerosità campionaria del gruppo di controlli sani risulta significativamente maggiore rispetto alla nostra (100). Pertanto, un maggior reclutamento di controlli potrebbe rappresentare un interessante sviluppo futuro del presente lavoro.

Altro dato emerso è il riscontro di livelli di miR-223 più elevati nei pazienti con GAI primaria rispetto ai pazienti GAM ($p=0.022$). Ciò può essere dovuto al fatto che, essendo miR-223 implicato nella risposta all'infezione da HP, l'eradicazione del batterio stesso nei pazienti GAM arruolati nello studio abbia ridotto l'espressione di questo miRNA nel siero. Uno studio del 2019, infatti, conferma tale risultato dimostrando come l'eradicazione di *Helicobacter pylori* porti ad una riduzione dell'espressione di miR-223 (101).

Alla base di questa differenza tra gli studi presenti in letteratura ed il nostro lavoro potrebbero esserci alcune caratteristiche intrinseche della popolazione oggetto di studio. I pazienti da noi selezionati infatti sono principalmente appartenenti agli stadi OLGA I e II (84% in totale), ma lo studio di Fassan et al. del 2017 dimostra come miR-223 sia in realtà maggiormente espresso in pazienti affetti da gastrite

atrofica di alto grado (OLGA III e IV) (98). Tale riscontro potrebbe far pensare che se il campione analizzato fosse rappresentato da un maggior numero di pazienti con stadio OLGA III o IV, i livelli circolanti di miR-223 sarebbero potuti risultare superiori e ricalcare quanto descritto in letteratura.

È doveroso affrontare infine la tematica della sperimentazione di nuove possibili tecniche diagnostico-terapeutiche basate sulla regolazione di miRNA da noi e da altri investigati. Le pathways interessate dall'attività dei miRNA, siano essi oncogeni ed oncosoppressori, sono svariate, ma riuscire a controllare l'up e la down-regolazione di questi monofilamenti nucleotidici potrebbe portare ad una svolta epocale nel controllo della storia naturale delle lesioni atrofiche, e più in generale di quelle precancerose, nei soggetti affetti. Uno studio del 2019 ha dimostrato ad esempio come l'eradicazione di HP porti ad una down-regolazione di miR-223 che è stato dimostrato essere associata ad una regressione della metaplasia pseudo-pilorica (SPEM), considerata una lesione precancerosa gastrica. Questa acquisizione potrebbe aprire nuovi scenari diagnostico-terapeutici nell'ambito delle gastriti atrofiche: infatti, il controllo dell'espressione genica dei miRNA aiuterebbe sia nel follow-up delle lesioni gastriche nei pazienti affetti da gastrite atrofica, identificando quelli a maggior rischio di progressione, sia, almeno potenzialmente, interferendo con la loro attività o espressione e facendo conseguentemente sì che il quadro istopatologico di questi soggetti possa non peggiorare e/o, in alcuni casi, anche regredire.

BIBLIOGRAFIA

1. Kulnigg-Dabsch S. Autoimmune gastritis. *Wien Med Wochenschr* 1946. 2016;166(13):424–30.
2. Lenti MV, Rugge M, Lahner E, Miceli E, Toh B-H, Genta RM, et al. Autoimmune gastritis. *Nat Rev Dis Primer*. 2020;6(1):1–19.
3. Kryssia IR-C, Marilisa F, Chiara M, Michele R, Antonio N, Gioacchino L, et al. Autoimmune diseases in autoimmune atrophic gastritis. *Acta Bio Medica Atenei Parm*. 2018;89(Suppl 8):100–3.
4. Wolf E-M, Plieschnegger W, Geppert M, Wigglinghaus B, Höss GM, Eherer A, et al. Changing prevalence patterns in endoscopic and histological diagnosis of gastritis? Data from a cross-sectional Central European multicentre study. *Dig Liver Dis*. 2014;46(5):412–8.
5. Miceli E, Lenti MV, Padula D, Luinetti O, Vattiato C, Monti CM, et al. Common Features of Patients With Autoimmune Atrophic Gastritis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(7):812–4.
6. Conti L, Annibale B, Lahner E. Autoimmune Gastritis and Gastric Microbiota. *Microorganisms*. 2020;8(11):1827.
7. Rugge M, Fassan M, Pizzi M, Zorzetto V, Maddalo G, Realdon S, et al. Autoimmune gastritis: histology phenotype and OLGA staging. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(12):1460–6.
8. Coati I, Fassan M, Farinati F, Graham DY, Genta RM, Rugge M. Autoimmune gastritis: Pathologist’s viewpoint. *World J Gastroenterol*. 2015;21(42):12179–89.
9. Massironi S, Zilli A, Elvevi A, Invernizzi P. The changing face of chronic autoimmune atrophic gastritis: an updated comprehensive perspective. *Autoimmun Rev*. 2019;18(3):215–22.
10. Minalyan A, Benhammou JN, Artashesyan A, Lewis MS, Pisegna JR. Autoimmune atrophic gastritis: current perspectives. *Clin Exp Gastroenterol*. 2017;10:19–27.
11. Song H, Held M, Sandin S, Rautelin H, Eliasson M, Söderberg S, et al. Increase in the Prevalence of Atrophic Gastritis Among Adults Age 35 to 44 Years Old in Northern Sweden Between 1990 and 2009. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(9):1592-1600.e1.
12. Zhang H, Jin Z, Cui R, Ding S, Huang Y, Zhou L. Autoimmune metaplastic atrophic gastritis in chinese: a study of 320 patients at a large tertiary medical center. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52(2):150–6.

13. Notsu T, Adachi K, Mishiro T, Fujihara H, Toda T, Takaki S, et al. Prevalence of Autoimmune Gastritis in Individuals Undergoing Medical Checkups in Japan. *Intern Med.* 2019;58(13):1817–23.
14. Neumann WL, Coss E, Rugge M, Genta RM. Autoimmune atrophic gastritis—pathogenesis, pathology and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(9):529–41.
15. Toh B-H. Diagnosis and classification of autoimmune gastritis. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4):459–62.
16. Lenti MV, Miceli E, Cococcia S, Klersy C, Staiani M, Guglielmi F, et al. Determinants of diagnostic delay in autoimmune atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;50(2):167–75.
17. Lahner E, Spoletini M, Buzzetti R, Corleto VD, Vannella L, Petrone A, et al. HLA-DRB1*03 and DRB1*04 are associated with atrophic gastritis in an Italian population. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* 2010;42(12):854–9.
18. Oksanen AM, Haimila KE, Rautelin HIK, Partanen JA. Immunogenetic characteristics of patients with autoimmune gastritis. *World J Gastroenterol.* 2010;16(3):354–8.
19. Negrini R, Savio A, Poiesi C, Appelmelk B, Buffoli F, Paterlini A, et al. Antigenic mimicry between *Helicobacter pylori* and gastric mucosa in the pathogenesis of body atrophic gastritis. *Gastroenterology.* 1996;111(3):655–65.
20. Amedei A, Bergman MP, Appelmelk BJ, Azzurri A, Benagiano M, Tamburini C, et al. Molecular Mimicry between *Helicobacter pylori* Antigens and H⁺,K⁺-Adenosine Triphosphatase in Human Gastric Autoimmunity. *J Exp Med.* 2003;198(8):1147–56.
21. Lahner E, Brigatti C, Marzinotto I, Carabotti M, Scalese G, Davidson HW, et al. Luminescent Immunoprecipitation System (LIPS) for Detection of Autoantibodies Against ATP4A and ATP4B Subunits of Gastric Proton Pump H⁺,K⁺-ATPase in Atrophic Body Gastritis Patients. *Clin Transl Gastroenterol.* 2017;8(1):e215.
22. Annibale B, Lahner E, Santucci A, Vaira D, Pasquali A, Severi C, et al. CagA and VacA are immunoblot markers of past *Helicobacter pylori* infection in atrophic body gastritis. *Helicobacter.* 2007;12(1):23–30.
23. Bergman MP, Faller G, D’Elios MM, Del Prete G, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Appelmelk BJ. Gastric Autoimmunity. In: *Helicobacter pylori* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2001
24. Furuta T, Baba S, Yamade M, Uotani T, Kagami T, Suzuki T, et al. High incidence of autoimmune gastritis in patients misdiagnosed with two or more failures of *H. pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;48(3):370–7.

25. Carabotti M, Lahner E, Esposito G, Sacchi MC, Severi C, Annibale B. Upper gastrointestinal symptoms in autoimmune gastritis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(1):e5784.
26. Kalkan Ç, Soykan I, Soydal Ç, Özkan E, Kalkan E. Assessment of Gastric Emptying in Patients with Autoimmune Gastritis. *Dig Dis Sci*. 2016;61(6):1597–602.
27. Tenca A, Massironi S, Pugliese D, Consonni D, Mauro A, Cavalcoli F, et al. Gastro-esophageal reflux and antisecretory drugs use among patients with chronic autoimmune atrophic gastritis: a study with pH-impedance monitoring. *Neurogastroenterol Motil*. 2016;28(2):274–80.
28. Kryssia IR-C, Marilisa F, Antonino N, Chiara M, Antonio N, Gioacchino L, et al. Clinical manifestations of chronic atrophic gastritis. *Acta Bio Medica Atenei Parm*. 2018;89(Suppl 8):88–92.
29. Livzan MA, Gaus OV, Mozgovoï SI, Bordin DS. Chronic Autoimmune Gastritis: Modern Diagnostic Principles. *Diagnostics*. 2021;11(11):2113.
30. Lahner E, Centanni M, Agnello G, Gargano L, Vannella L, Iannoni C, et al. Occurrence and risk factors for autoimmune thyroid disease in patients with atrophic body gastritis. *Am J Med*. 2008;121(2):136–41.
31. Lahner E, Norman GL, Severi C, Encabo S, Shums Z, Vannella L, et al. Reassessment of Intrinsic Factor and Parietal Cell Autoantibodies in Atrophic Gastritis With Respect to Cobalamin Deficiency. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG*. 2009;104(8):2071–9.
32. Yang G-T, Zhao H-Y, Kong Y, Sun N-N, Dong A-Q. Correlation between serum vitamin B12 level and peripheral neuropathy in atrophic gastritis. *World J Gastroenterol*. 2018;24(12):1343–52.
33. Rusak E, Chobot A, Krzywicka A, Wenzlau J. Anti-parietal cell antibodies – diagnostic significance. *Adv Med Sci*. 2016;61(2):175–9.
34. Bizzaro N, Antico A. Diagnosis and classification of pernicious anemia. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4):565–8.
35. Antico A, Tampoia M, Villalta D, Tonutti E, Tozzoli R, Bizzaro N. Clinical Usefulness of the Serological Gastric Biopsy for the Diagnosis of Chronic Autoimmune Gastritis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:e520970.
36. Lombardo L, Leto R, Molinaro G, Migliardi M, Ravarino N, Rocca R, et al. Prevalence of atrophic gastritis in dyspeptic patients in Piedmont. A survey using the GastroPanel test. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(9):1327–32.
37. Telaranta-Keerie A, Kara R, Paloheimo L, Härkönen M, Sipponen P. Prevalence of undiagnosed advanced atrophic corpus gastritis in Finland: an observational study among 4,256 volunteers without specific complaints. *Scand J Gastroenterol*. 2010;45(9):1036–41.

38. McNicholl AG, Forné M, Barrio J, De la Coba C, González B, Rivera R, et al. Accuracy of GastroPanel for the diagnosis of atrophic gastritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2014;26(9):941–8.
39. Zhang C, Huang Y, Long J, Yao X, Wang J, Zang S, et al. Serum chromogranin A for the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms and its association with tumour expression. *Oncol Lett.* 2019;17(2):1497–504.
40. Peracchi M, Gebbia C, Basilisco G, Quatrini M, Tarantino C, Vescarelli C, et al. Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(3):443–8.
41. Massironi S, Fraquelli M, Paggi S, Sangiovanni A, Conte D, Sciola V, et al. Chromogranin A levels in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* 2009;41(1):31–5.
42. Park JY, Lam-Himlin D, Vemulapalli R. Review of autoimmune metaplastic atrophic gastritis. *Gastrointest Endosc.* 2013;77(2):284–92.
43. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(10):1161–81.
44. De Block CEM, De Leeuw IH, Van Gaal LF. Autoimmune Gastritis in Type 1 Diabetes: A Clinically Oriented Review. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):363–71.
45. Amerio P, Tracanna M, De Remigis P, Betterle C, Vianale L, Marra ME, et al. Vitiligo associated with other autoimmune diseases: polyglandular autoimmune syndrome types 3B + C and 4. *Clin Exp Dermatol.* 2006;31(5):746–9.
46. Zelissen PMJ, Bast EJEG, Croughs RJM. Associated Autoimmunity in Addison’s Disease. *J Autoimmun.* 1995;8(1):121–30.
47. Chang K-H, Lyu R-K, Ro L-S, Wu Y-R, Chen C-M. Coexistence of Pernicious Anemia and Myasthenia Gravis—A Rare Combination of Autoimmune Diseases in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2006;105(11):946–9.
48. Kalkan Ç, Soykan I. Polyautoimmunity in autoimmune gastritis. *Eur J Intern Med.* 2016;31:79–83.
49. Venerito M, Radünz M, Reschke K, Reinhold D, Frauenschläger K, Jechorek D, et al. Autoimmune gastritis in autoimmune thyroid disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41(7):686–93.

50. Borch K, Ahrén B, Ahlman H, Falkmer S, Granérus G, Grimelius L. Gastric Carcinoids. *Ann Surg.* 2005;242(1):64–73.
51. Vannella L, Lahner E, Osborn J, Annibale B. Systematic review: gastric cancer incidence in pernicious anaemia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37(4):375–82.
52. Rugge M, Genta RM. Staging and grading of chronic gastritis. *Hum Pathol.* 2005;36(3):228–33.
53. Pimentel-Nunes P, Libânio D, Marcos-Pinto R, Areia M, Leja M, Esposito G, et al. Management of epithelial precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS II): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), European Society of Pathology (ESP), and Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED) guideline update 2019. *Endoscopy.* 2019;51(4):365–88.
54. Lahner E, Hassan C, Esposito G, Carabotti M, Zullo A, Dinis-Ribeiro M, et al. Cost of detecting gastric neoplasia by surveillance endoscopy in atrophic gastritis in Italy: A low risk country. *Dig Liver Dis.* 2017;49(3):291–6.
55. Jorge AD, Sanchez D. The effect of azathioprine on gastric mucosal histology and acid secretion in chronic gastritis. *Gut.* 1973;14(2):104–6.
56. Strickland RG, Fisher JM, Lewin K, Taylor KB. The response to prednisolone in atrophic gastritis: a possible effect on non-intrinsic factor-mediated vitamin B12 absorption. *Gut.* 1973;14(1):13–9.
57. Stabler SP. Vitamin B12 Deficiency. *N Engl J Med.* 2013;368(2):149–60.
58. Langan RC, Goodbred AJ. Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management. *Am Fam Physician.* 2017;96(6):384–9.
59. Wang H, Li L, Qin LL, Song Y, Vidal-Alaball J, Liu TH. Oral vitamin B₁₂ versus intramuscular vitamin B₁₂ for vitamin B₁₂ deficiency. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018
60. Rustgi SD, Bijlani P, Shah SC. Autoimmune gastritis, with or without pernicious anemia: epidemiology, risk factors, and clinical management. *Ther Adv Gastroenterol.* 2021;14:17562848211038772.
61. Berlin H, Berlin R, Brante G. Oral Treatment of Pernicious Anemia with High Doses of Vitamin B12 Without Intrinsic Factor. *Acta Med Scand.* 1968;184(1–6):247–58.
62. Bensky MJ, Ayalon-Dangur I, Ayalon-Dangur R, Naamany E, Gafter-Gvili A, Koren G, et al. Comparison of sublingual vs. intramuscular administration of vitamin B12 for the treatment of patients with vitamin B12 deficiency. *Drug Deliv Transl Res.* 2019;9(3):625–30.

63. Birgegård G, Henry D, Glaspy J, Chopra R, Thomsen LL, Auerbach M. A Randomized Noninferiority Trial of Intravenous Iron Isomaltoside versus Oral Iron Sulfate in Patients with Nonmyeloid Malignancies and Anemia Receiving Chemotherapy: The PROFOUND Trial. *Pharmacotherapy*. 2016;36(4):402–14.
64. Okam MM, Koch TA, Tran M-H. Iron Supplementation, Response in Iron-Deficiency Anemia: Analysis of Five Trials. *Am J Med*. 2017;130(8):991.e1-991.e8.
65. Stolte M, Meier E, Meining A. Cure of autoimmune gastritis by *Helicobacter pylori* eradication in a 21-year-old male. *Z Gastroenterol*. 1998;36(8):641–3.
66. Faller G, Winter M, Steininger H, Lehn N, Meining A, Bayerdörffer E, et al. Decrease of antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* gastritis after cure of infection. *Pathol Res Pract*. 1999;195(4):243–6.
67. Nikou GC, Angelopoulos TP. Current concepts on gastric carcinoid tumors. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:287825.
68. Fossmark R, Sørdal Ø, Jianu CS, Qvigstad G, Nordrum IS, Boyce M, et al. Treatment of gastric carcinoids type I with the gastrin receptor antagonist netazepide (YF476) results in regression of tumours and normalisation of serum chromogranin A. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36(11–12):1067–75.
69. Massironi S, Zilli A, Fanetti I, Ciafardini C, Conte D, Peracchi M. Intermittent treatment of recurrent type-1 gastric carcinoids with somatostatin analogues in patients with chronic autoimmune atrophic gastritis. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2015;47(11):978–83.
70. Kwekkeboom DJ, Krenning EP. Peptide Receptor Radionuclide Therapy in the Treatment of Neuroendocrine Tumors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(1):179–91.
71. Barwari T, Joshi A, Mayr M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(23):2577–84.
72. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509–24.
73. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing Beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*. 2016;64(2):320–33.
74. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol*. 2018;9:402.
75. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3(3):311–30.

76. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1202–7.
77. Huang W. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1617:57–67.
78. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460–9.
79. Wang S, Wan X, Ruan Q. The MicroRNA-21 in Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):864.
80. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:3–55.
81. Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M, Song SJ. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1723.
82. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524–9.
83. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy. *Curr Mol Med*. 2012;12(1):27–33.
84. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18081–6.
85. Alessandrini L, Manchi M, De Re V, Dolcetti R, Canzonieri V. Proposed Molecular and miRNA Classification of Gastric Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1683.
86. Shin VY, Chu K-M. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer. *World J Gastroenterol WJG*. 2014;20(30):10432–9.
87. Link A, Kupcinskas J. MicroRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer: Current insights and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2018;24(30):3313–29.
88. Sun X, Zhang K, Li D. Prognostic potential of miR-21-3p in gastric cancer. *J BUON Off J Balk Union Oncol*. 2020;25(6):2678–82.
89. Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest*. 2008;88(12):1358–66.

90. Peng L, Sang H, Wei S, Li Y, Jin D, Zhu X, et al. circCUL2 regulates gastric cancer malignant transformation and cisplatin resistance by modulating autophagy activation via miR-142-3p/ROCK2. *Mol Cancer*. 2020;19:156.
91. Lu J, Ma Y, Zhao Z. MiR-142 suppresses progression of gastric carcinoma via directly targeting LRP8. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2021;45(4):101520.
92. Cheng Z, Liu G, Huang C, Zhao X. Upregulation of circRNA_100395 sponges miR-142-3p to inhibit gastric cancer progression by targeting the PI3K/AKT axis. *Oncol Lett*. 2021;21(5):419.
93. Yin L, Liu T, Li C, Yan G, Li C, Zhang J, et al. The MRTF-A/miR-155/SOX1 pathway mediates gastric cancer migration and invasion. *Cancer Cell Int*. 2020;20:303.
94. Shi S-S, Zhang H-P, Yang C-Q, Li L-N, Shen Y, Zhang Y-Q. Exosomal miR-155-5p promotes proliferation and migration of gastric cancer cells by inhibiting TP53INP1 expression. *Pathol - Res Pract*. 2020;216(6):152986.
95. Ma Z, Ma Y, Xia Q, Li Y, Li R, Chang W, et al. MicroRNA-155 expression inversely correlates with pathologic stage of gastric cancer and it inhibits gastric cancer cell growth by targeting cyclin D1. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(6):1201–12.
96. Li S, Zhang T, Zhou X, Du Z, Chen F, Luo J, et al. The tumor suppressor role of miR-155-5p in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2018;16(2):2709–14.
97. Yang F, Xu Y, Liu C, Ma C, Zou S, Xu X, et al. NF- κ B/miR-223-3p/ARID1A axis is involved in Helicobacter pylori CagA-induced gastric carcinogenesis and progression. *Cell Death Dis*. 2018;9(1):12.
98. Fassan M, Saraggi D, Balsamo L, Realdon S, Scarpa M, Castoro C, et al. Early miR-223 Upregulation in Gastroesophageal Carcinogenesis. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(3):301–8.
99. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P, Batts KP, Dahms BB, et al. Classification and grading of Gastritis: The updated Sydney system. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(10):1161–81.
100. Aalami AH, Pouresmaeil V, Amirabadi A, Mojahed FH, Rad MQ, Sahebkar A. Evaluation of the Diagnostic Properties of Serum hsa-miR-223-5p in the Detection of Gastric Cancer: A Case-Control Study. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020 20(7):800–8.
101. Kuo H-Y, Chang W-L, Yeh Y-C, Cheng H-C, Tsai Y-C, Wu C-T, et al. Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia associated with higher expressions of miR-21, 155, and 223 can be regressed by Helicobacter pylori eradication in the gastric cancer familial relatives. *Helicobacter*. 2019;24(3):e12578.