



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

**FACTORES AMBIENTALES DE RIESGO ASOCIADOS
A LA ENFERMEDAD CELIACA EN POBLACIÓN CON
SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Paula Crespo Escobar

Dirigida por:

Dra. Carmen Ribes Koninckx

Tutorizada por:

Dra. M. Adela Cañete Nieto

Valencia, 2017

CERTIFICADO IDONEIDAD

Dña, **Carmen Ribes Koninckx**, Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia, y Dña **Adela Cañete Nieto**, Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia y Profesora Titular de Universidad, del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN QUE,

Dña **Paula Crespo Escobar**, graduada en Nutrición y Humana y Dietética, graduada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, y Máster en Nutrición Personalizada y Comunitaria, ha realizado, bajo su dirección y tutela, el trabajo de investigación titulado: “**Factores ambientales de riesgo asociados a la enfermedad celiaca en población con susceptibilidad genética**” para optar al grado de Doctora en Medicina.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, a 18 de septiembre de 2017.

Fdo:

Fdo:

Carmen Ribes-Koninckx

Adela Cañete Nieto

***A todas y cada una de las personas que me
han acompañado en este camino.***

Agradecimientos

A todos los niños y niñas que han participado en este estudio, a sus padres por la confianza y la colaboración en este proyecto.

A todo el Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital Universitario La Fe, por haberme “criado” y cuidado durante tanto tiempo: Begoña, Etna, Ester, Isa, Isabel, Merche, Águeda y Puri.

A Ester, por su ayuda desinteresada en esto y en todo, a ella y a Etna, gracias por calmar los nervios innecesarios.

A mi tutora Adela Cañete, gracias por aceptar sin condiciones la tutoría de esta tesis.

A los “niños”, María, por estar siempre dispuesta, a todo, sin preguntar, sin rechistar, sin pedir nada a cambio. A Sara, por “administrar y gestionar” los delirios de cada día y sus dosis de realismo. A Sandra, por llegar con aire fresco cuando más oxígeno me faltaba. A Quim, por su paciencia con mi impaciencia durante tantos años, porque siendo él tan teórico y yo tan práctica, un día encontramos el equilibrio.

A la Unidad de Bioestadística, David y Viqui, por su inestimable ayuda con los análisis de este trabajo, ¡ellos sí que son estadísticamente significativos!

A mis amigos, la familia que uno elige. A todos y cada uno de ellos y ellas que se han alegrado por cada página escrita de esta tesis, me han alentado a seguir en momentos de desesperación y han aguantado los interminables audios con mis penas. Especialmente a Laura y María, que aun conociéndome y aguantándome desde que nací, siguen estando ahí.

A Amalia, tan lejos de aquí, y tan cerca en este trabajo.

A Miguel, por llegar en el momento justo para quedarte. Gracias por tu apoyo incondicional, por creer en mí y por hacerme creer a mí. Gracias por quitar las piedras de esta tesis para allanarme el camino.

A mis padres, mis referencias vitales, no habrá páginas suficientes para agradecerles lo que hacen cada día por mí. Ellos me han enseñado que es de bien nacidos ser agradecidos, por eso, creo que es una buena ocasión para manifestarles mi cariño, mi permanente y profundo agradecimiento. Gracias por los valores y consejos, por las enseñanzas y experiencias, por el ejemplo y amor, por dejar que me equivoque, por dejarme elegir, por aguantar lo peor y sacar lo mejor y por supuesto, por el apoyo incondicional, días tras días. Gracias por haber hecho de mi lo que soy.

A mi otra mitad, mi hermano, tan diferente y tan necesario, gracias.

Y por último, GRACIAS Dra. Ribes, nunca podré corresponder como merece por el tiempo, dedicación y conocimiento empleados en mi formación. Gracias de todo corazón por ser una maestra infatigable y luchadora; guía y referente desde mis primeros pasos en el mundo laboral, transmitiéndome cada día, su pasión por la investigación que me ha llevado hasta aquí. Gracias por descubrirme el apasionante mundo de la enfermedad celiaca, por dejarme haber formado parte de su equipo y por todas las ocasiones y oportunidades personales y profesionales que me ha brindado durante estos años. Y por supuesto, gracias por su inestimable ayuda como directora de esta tesis doctoral. Le estaré eternamente agradecida.

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS	10
LISTA DE TABLAS.....	12
LISTA DE FIGURAS	14
I. INTRODUCCIÓN	17
1. Definición	19
2. Epidemiología	19
3. Espectro clínico de la enfermedad celiaca.....	23
3.1 Enfermedad celiaca sintomática	24
3.2 Enfermedad celiaca silente	28
3.3 Enfermedad celiaca latente.....	29
3.4 Enfermedad celiaca potencial	29
3.5 Enfermedad celiaca refractaria	30
4. Etiopatogenia.....	32
4.1 Factores genéticos	33
4.1.1 El sistema HLA	34
4.1.2 Otros genes no-HLA	38
4.2 Factores inmunológicos	44
4.3 Factores ambientales	47
4.3.1 El gluten	47
4.3.1.1 Edad de introducción del gluten y lactancia materna.	52
4.3.1.2 Cantidad de gluten.....	58
4.3.2 El trigo.....	59
4.3.3 La microbiota	63
5. Diagnóstico	67
6. Tratamiento	74

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	79
1. Hipótesis	81
2. Objetivos	83
III. MATERIAL Y MÉTODOS	85
1. Sujetos objeto del estudio	87
2. Diseño del estudio	88
3. Materiales	95
4. Métodos	97
4.1 Desarrollo y validación de los cuestionarios de frecuencia de consumo.	97
4.1.1 Análisis estadístico	107
4.2. Análisis de la influencia de los factores ambientales de riesgo en el desarrollo de la enfermedad celiaca.	108
4.2.1 Cantidad de gluten.....	109
4.2.2 Tipo de gluten	111
4.2.3 Análisis estadístico	112
4.3 Análisis de la subcohorte Española	115
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
1. Desarrollo y validación de los cuestionarios de frecuencia de consumo.	121
1.1 Características de la muestra.....	121
1.2 Resultados.....	122
1.3 Discusión	127
2. Cantidad de gluten consumida y riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.	131
2.1 Características de la muestra.....	131
2.2 Consumo de gluten en la población de estudio.	133
2.2.1 Cohorte general.....	133
2.2.2 Grupo de intervención	137
2.2.3 Género.....	140
2.2.4 Casos diagnosticados de EC y no-EC	143

2.3 Cantidad de gluten consumida y riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.....	147
2.4 Características genotípicas de los casos diagnosticados de enfermedad celiaca.....	151
2.5 Discusión.....	152
3. Tipo de trigo consumido y riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.....	158
3.1 Características de la muestra.....	158
3.2 Patrón de consumo de productos con gluten de la cohorte total.....	159
3.3 Patrón de consumo de productos con gluten de los casos diagnosticados de enfermedad celiaca y los no diagnosticados.	161
3.4 Tipo de trigo consumido.....	164
3.4.1 Grupo de intervención y género.....	166
3.5 Tipo de trigo consumido y riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.....	167
3.6 Discusión.....	170
4. Análisis la subcohorte Española.....	173
4.1 Características de la muestra.....	173
4.2 Factores ambientales: gluten y lactancia materna.....	175
4.3 Riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.....	177
4.4 Características de los casos diagnosticados de enfermedad celiaca.....	179
4.5 Discusión.....	182
V. CONCLUSIONES.....	187
1. Conclusiones.....	189
2. Aplicaciones prácticas.....	191
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	193
VII. ANEXOS.....	233

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

- EC: Enfermedad Celiaca
- HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos
- LIE: Linfocitos Intraepiteliales
- DSG: Dieta sin gluten
- GWAS: Genome Wide Association Studies
- TGt: Transglutaminasa Tisular
- SNPs: Polimorfismos de un único nucleótido.
- TNF α : Factor de Necrosis Tumoral
- IFN γ : Interferón.
- HMW-GS: Gluteninas de alto peso molecular.
- LMW-GS: Gluteninas de bajo peso molecular:
- ESPGHAN: European Society for Paediatric, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.
- AAE: Anticuerpos Antiendomiso
- Anti-TG2: Anticuerpos antitransglutaminasa tipo 2
- Anti-DGP: Anticuerpos antigliadina deaminada
- IgA: inmunoglobulina A
- Kg: kilogramos
- g: gramos
- CFC: Cuestionarios de frecuencia de consumo

- AGA: anticuerpos antigliadina de clase IgA
- IMDG: Ingesta Media Diaria de Gluten
- RD-7: Registro dietético de 7 días
- RD-2: Registro dietético de 2 días.
- ND: Datos no disponibles
- SD: Desviación estándar
- IC: Intervalo de confianza
- HR: Ratios de riesgo

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales diferencias entre la EC clásica, silente, latente y potencial.....	30
Tabla 2. Cuándo investigar la EC de acuerdo a las nuevas guías de diagnóstico la ESPGHAN 2012.....	68
Tabla 3. Cronograma de intervenciones, determinaciones y recogida de muestras realizadas durante el estudio.	92
Tabla 4. Ingesta media diaria de gluten, obtenida de los RD-2, RD-7 y CFC en ambos grupos de edad (7-12 meses y 13-36 meses).....	123
Tabla 5. Contribución en porcentaje (%), de los diferentes grupos de alimentos, a la ingesta total de gluten, en diferentes meses de edad....	124
Tabla 6. Características de la población de estudio.....	132
Tabla 7. Ingesta media diaria de gluten por país y patrón de consumo de gluten estimado y ajustado mediante un modelo de regresión segmentada.....	135
Tabla 8. Ingesta media diaria de gluten por grupo de intervención (gluten o placebo)* y mes.....	138
Tabla 9. Ingesta media diaria de gluten por género (masculino o femenino) y mes.....	141
Tabla 10. Ingesta media diaria de gluten por casos (diagnosticados de enfermedad celiaca y no diagnosticados) y mes.....	144
Tabla 11. Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC.....	148

Tabla 12. Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC, incluyendo el tipo de trigo consumido (tomando <i>Triticum aestivum</i> como referencia).....	168
Tabla 13. Características generales de la subcohorte Española.....	174
Tabla 14. Ingesta media diaria de gluten por centro de investigación y según diagnóstico, EC versus no-EC, en el momento del estudio.....	176
Tabla 15. Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC de la subcohorte española.....	178

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Iceberg de la enfermedad celiaca.....	21
Figura 2. Etiopatogenia de la enfermedad celiaca.....	33
Figura 3. Esquema del sistema HLA.....	35
Figura 4. Historia de la genética de la enfermedad celiaca. Técnicas utilizadas y genes potencialmente relacionados con la enfermedad, hallados con cada técnica.....	43
Figura 5. Esquema simplificado de la etiopatogenia de la enfermedad celiaca.....	46
Figura 6. Esquema de la composición de los cereales de la familia Triticeae.....	49
Figura 7. Secuencia de aminoácidos de la α -gliadina.....	51
Figura 8. El número estimado de nuevos casos de EC anualmente en la población infantil sueca durante el período comprendido entre 1973 y 2009.....	55
Figura 9. Evolución simplificada de las especies de trigo, desde las variedades ancestrales, hasta las variedades hexaploides....	61
Figura 10. Algoritmo diagnóstico para pacientes pediátricos con sospecha clínica de EC (sintomáticos).....	72
Figura 11. Algoritmo diagnóstico para pacientes pediátricos asintomáticos, pertenecientes a grupos de riesgo.....	73
Figura 12. Gráfico de Bland-Altman de la ingesta media de gluten, evaluando la concordancia entre el RD-2 y el CFC.....	125

Figura 13. Gráfico de Bland-Altman de la ingesta media de gluten, evaluando la concordancia entre el RD-7 y el CFC.....	126
Figura 14. Representación de la ingesta media diaria de gluten (g/día) y del patrón de consumo, definido por una pendiente inicial (de 11 a 18 meses), un consumo de gluten estimado a los 18 meses y una pendiente final (de 18 a 36 meses), para cada país.....	137
Figura 15. Ingesta media diaria de gluten y SD (líneas verticales) en casos diagnosticados de EC y no-EC, por país y mes.....	146
Figura 16. Representación gráfica de la interacción de las variables “pendiente inicial” (Ingesta media diaria de gluten de 11 a 18 meses) y grupo de riesgo HLA.....	151
Figura 17. Consumo total de los diferentes tipos de productos sin gluten en gramos/día, por país y mes.....	162
Figura 18. Cantidad de gluten consumida procedente de los diferentes productos, en cada país por mes.....	163
Figura 19. Consumo total de los diferentes tipos trigo (<i>Triticum aestivum</i> y <i>Triticum durum</i>), por mes y por país.....	166
Figura 20. Ingesta media diaria de gluten (g/día) en los diferentes centros de investigación españoles.....	177

I. INTRODUCCIÓN

1. Definición

La enfermedad celiaca (EC), es un trastorno sistémico permanente, provocado por una reacción inmunitaria activada por la ingestión de gluten y proteínas relacionadas, que se da en personas portadoras de los haplotipos DQ2 y/o DQ8 del antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA, por sus siglas en inglés, *Human Leukocyte Antigen*) de clase II, y que se caracteriza por una combinación variable de títulos elevados de anticuerpos específicos de la celiacía, una enteropatía inflamatoria con grados variables de gravedad y una amplia gama de síntomas digestivos y/o sistémicos (Husby et al., 2012; Mäki, 2012; Ludvigsson et al., 2013).

2. Epidemiología

Actualmente, la EC es la enteropatía inducida por un alimento más común del mundo occidental, con una prevalencia aproximada de 1:100-200 nacidos vivos (Rostom et al., 2005). Sin embargo, la información disponible sobre la epidemiología de la EC ha ido cambiando a lo largo de los años, aumentando el número de casos diagnosticados drásticamente con el desarrollo de pruebas serológicas de alta sensibilidad y especificidad y con un mayor conocimiento de las formas de manifestación de la enfermedad. Los estudios epidemiológicos más antiguos se basaban solo en los casos diagnosticados con sintomatología clásica, y reportaban unas cifras de prevalencia muy bajas (1:3.333) y muy variables en Europa. Además, se pensaba que la EC era exclusiva

de la población caucásica y particular de los niños (Catassi, Gatti, & Fasano, 2014). Sin embargo, en la actualidad, los estudios epidemiológicos poblacionales, basados en la búsqueda activa de casos, mediante el uso de test serológicos, han aportado datos mucho más reales de prevalencia y con menos variabilidad. Actualmente se estima que la prevalencia de EC es de 1:100, tanto en niños como en adultos, con una variabilidad de entre el 0,5-1,26%, estos datos han sido obtenidos a partir de diferentes estudios de despistaje llevados a cabo en población sana asintomática (Dubé et al., 2005; Catassi, Gatti, & Lionetti, 2015). Estos estudios poblacionales, nos indican que el incremento de casos de EC no solo se debe a la existencia de una epidemia, sino principalmente al desarrollo de métodos de diagnóstico más sensibles y específicos, al conocimiento de las distintas formas de manifestación de la EC y al aumento de la concienciación de la enfermedad por parte de la comunidad clínica y sanitaria (Barkin, 2006).

El concepto de la epidemiología de la EC, se conceptualiza como un iceberg (**Figura 1**). La prevalencia de EC, puede ser concebida como el tamaño total del iceberg, donde la punta visible representa los casos diagnosticados correctamente que cursan con sintomatología digestiva clásica de la enfermedad, marcadores serológicos positivos y atrofia vellositaria evidente. Por cada uno de estos casos diagnosticados, se estima que existe un promedio de 5-10 casos que siguen sin diagnosticar, que cursan de forma atípica o asintomática, siendo este porcentaje la parte sumergida del iceberg (Fasano & Catassi, 2012). En los países

desarrollados, la línea que separa la proporción de casos diagnosticados y no diagnosticados, depende, en gran medida, del conocimiento de la enfermedad por parte de los profesionales y la tendencia a solicitar marcadores serológicos específicos de EC en situaciones de sospecha clínica dudosa (Gujral, Freeman, & Thomson, 2012).

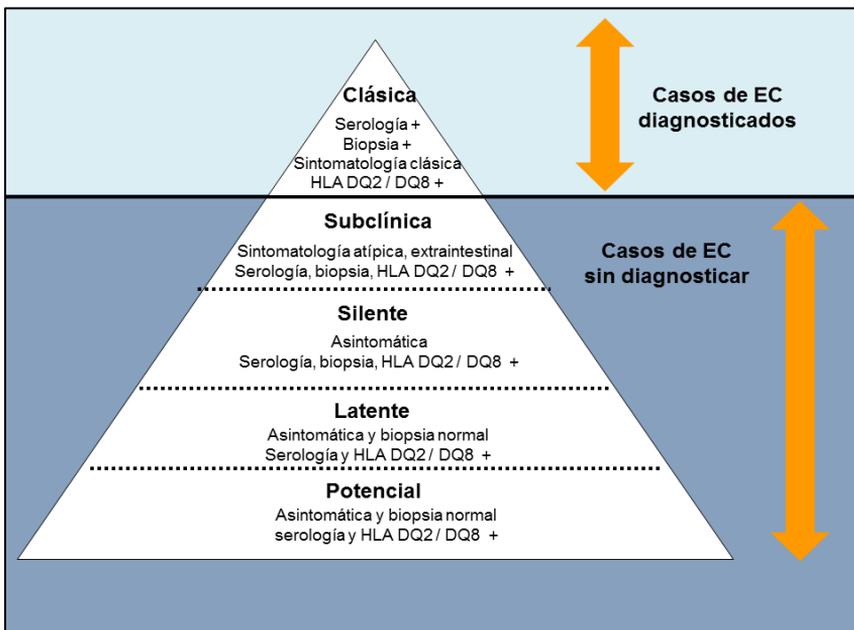


Figura 1. Iceberg de la enfermedad celiaca. EC: Enfermedad Celiaca.

En cuanto a la distribución geográfica de la EC, también existen diferencias entre países. Éstas se atribuyen sobre todo a las diferencias en la prevalencia y distribución de los alelos de riesgo HLA, así como a las diferencias en los hábitos alimentarios de las distintas poblaciones. El proceso de globalización, ha implicado que el consumo de gluten se haya extendido por todo el mundo, incluso en poblaciones consumidoras

tradicionalmente de cereales sin gluten, lo que ha provocado un aumento de la expresión de la enfermedad.

En Europa, considerada como la cuna de la investigación de esta enfermedad, la prevalencia media es aproximadamente del 1% de la población. Sin embargo, cabe destacar algunas diferencias significativas entre países, por ejemplo, en Alemania, la prevalencia se estima solo en un 0,2%, mientras que en Finlandia y Suecia se ha comprobado que afecta a más del 2% de la población (Olsson, Stenlund, Hörnell, Hernell, & Ivarsson, 2009; Myleus et al., 2009; Mustalahti et al., 2010). Los estudios más recientes realizados en España en las Comunidades Autónomas de Asturias, Madrid y País Vasco, indican una prevalencia en adultos de 1:370 y en niños de 1:118 – 1:220 (Riestra, Fernandez, Rodrigo, Garcia, & Ocio, 2000; Pascual et al., 2002; Castaño et al., 2004).

En el continente americano, la prevalencia es similar a la de Europa, entorno al 1% de la población (Fasano et al., 2003). Un reciente estudio mostró cómo en Estados Unidos, la prevalencia había pasado de un 0,2% en 1975 hasta el 1% actual, es decir 5 veces más, y atribuyeron este aumento a los factores citados anteriormente, mayor conocimiento de la enfermedad y métodos de diagnóstico más precisos (Catassi et al., 2010). Por otro lado, en Latino América, los últimos estudios indican que la prevalencia es similar a la de la población europea, aunque existen regiones, como Uruguay, con escasos datos sobre la misma (Parra-Medina et al., 2015). En China, los últimos análisis realizados, muestran que la prevalencia de EC es más común de lo que siempre se ha

considerado. Concretamente, las poblaciones chinas del norte y noreste tienen mayor prevalencia que las poblaciones del sur. Los autores atribuyen estas diferencias principalmente a las diferencias genéticas, al mayor consumo de cereales con gluten y al mayor conocimiento de la enfermedad en las regiones del sur (Yuan et al., 2013). En la India, donde el trigo es un alimento básico, se estimó una prevalencia del 0,3% en escolares. Los autores sostienen que aun así, la EC está infradiagnosticada en el norte de la India (Pooni, Chhina, Jaina, Singh, & Gautam, 2006; Kochhar et al., 2012). En cambio, en países como Japón, Indonesia, Corea (norte y sur), Filipinas e islas del Pacífico, la prevalencia de EC es muy baja debido a la baja frecuencia de individuos HLA-DQ2 positivos y bajo consumo de cereales con gluten (Kang, Kang, Green, Gwee, & Ho, 2013).

Por último, destacar los datos de prevalencia de EC en el continente africano, donde el 40% de la población saharauí es portadora del HLA DQ2 y la prevalencia se estima en aproximadamente el 5% (Catassi et al., 2014).

3. Espectro clínico de la enfermedad celiaca

Como se ha descrito en la Figura 1, la EC clásica que cursa con sintomatología digestiva, representa solo la punta del iceberg, una pequeña parte del amplio espectro de la enfermedad. En la base, se encontrarían las formas subclínicas que cursan con sintomatología extradigestiva, las formas silentes, la EC denominada latente y EC

potencial. Todas estas formas de presentación conforman el espectro clínico de la EC.

3.1 Enfermedad celiaca sintomática

La EC sintomática, es la que debuta con sintomatología digestiva o extradigestiva, marcadores serológicos específicos positivos, HLA-DQ2/DQ8 positivos y alteraciones en la mucosa intestinal.

Sintomatología clásica

La primera vez que se describió la presentación de la EC con sintomatología clásica, fue en 1888 por Samuel Gee, que la definía como *“indigestión crónica que se presenta en individuos de cualquier edad, afectando más a los niños de uno a cinco años. Los signos de la enfermedad son las deposiciones blandas, pero no líquidas, voluminosas y pálidas. El comienzo de la enfermedad es progresivo y la existencia de caquexia es constante. El vientre es especialmente blando y frecuentemente distendido [...]”* (Gee S., 1888)

Hoy en día, la forma clásica de la enfermedad, más frecuente en la primera infancia, se considera aquella que cursa con sintomatología digestiva predominante. Aunque las características clínicas difieren considerablemente en función de la edad de presentación, podemos destacar como síntomas digestivos clásicos la diarrea crónica y malabsortiva, vómitos, cambios de carácter, retraso en el crecimiento, estancamiento y/o pérdida de peso, talla baja, falta de apetito, distensión y/o dolor abdominal. También son muy característicos la apatía, la merma

de la actividad dinámica y el cansancio, como síntomas asociados (Mäki et al., 2003; Fasano, 2005; Fasano, 2005b).

Si con esta clínica, no se hace un diagnóstico y tratamiento correcto, puede dar lugar a la llamada “crisis celiaca”, que es la forma más grave de la enfermedad. En este cuadro se producen graves alteraciones digestivas, hematológicas, debido a la falta de absorción de la vitamina K a nivel del intestino, también se pueden producir edemas por hipoalbuminemia, y deshidratación hipotónica por la hipopotasemia. Aunque actualmente es un cuadro infrecuente y se diagnostica de forma excepcional, hasta hace relativamente poco era una de las formas de inicio de la enfermedad (Mones et al., 2007; Jamma et al., 2010).

Sintomatología atípica

Las manifestaciones clínicas atípicas suelen darse cuando la sintomatología digestiva clásica es poco llamativa o incluso inexistente. Esta forma de presentación es más frecuente en niños mayores, adolescentes y adultos. Los principales síntomas son:

- Estreñimiento asociado o no a dolor abdominal de tipo cólico o de distensión abdominal.
- Retraso de la talla y/o de la pubertad. Esta complicación es cada vez menos frecuente debido a que el diagnóstico precoz permite establecer un tratamiento rápido y acertado que, normalmente, da lugar a la recuperación de la misma. Sin embargo, si el retraso de la talla se produce entorno a la etapa puberal, puede ocurrir que las

consecuencias sobre el crecimiento sean irreversibles, dejando secuelas en la edad adulta (Reilly et al., 2011).

- Déficit de hierro y ácido fólico. Tanto la ferropenia, la anemia como la folicopenia, son las alteraciones hematológicas más frecuentes asociadas a la EC. Las principales causas de estos síntomas son la alteración de la absorción del hierro y ácido fólico a nivel del intestino, debido a la lesión de la mucosa, y la existencia de pérdidas ocultas de sangre a través del intestino. Un 5% de los pacientes con anemia ferropénica tienen EC, y se recuperan tras el diagnóstico. De hecho, se recomienda que ante toda anemia ferropénica de origen desconocido que no responde bien al tratamiento de administración de hierro oral, se realice una endoscopia con toma de muestras de biopsia duodenales para descartar una posible EC (Zhu, Kaneshiro, & Kaunitz, 2010).
- Dermatitis hepitifforme (DH). Considerada la manifestación mucocutánea característica de la EC, la DH se manifiesta aproximadamente en el 20-30% de los individuos con EC y su presencia se considera un signo inequívoco de una EC concomitante (Collin, Salmi, Hervonen, Kaukinen, & Reunala, 2016). La DH que consiste en una erupción cutánea con ampollas extremadamente pruriginosas, remite espontáneamente solo en un 10-15% de los casos, responde rápida pero transitoriamente al tratamiento farmacológico y lo hace de forma definitiva a la dieta sin gluten (Cardones & Hall, 2012).

- Hipertransaminasemia. En el momento del diagnóstico de EC, aproximadamente un 30% de los casos presentan niveles de transaminasas elevados, debido a una hepatitis reactiva inespecífica. Sin embargo, en los casos en los que la hipertransaminasemia es debido a la EC, las alteraciones analíticas y las lesiones histológicas, desaparecen tras la eliminación de gluten en la dieta (Farre et al., 2002). Aunque no se conoce su patogenia, se relaciona con el aumento de la permeabilidad intestinal característica de EC, que permitiría la entrada de toxinas y antígenos al hígado. Actualmente se estima que la EC es la causa de un 10% de las hipertransaminasemias criptogénicas y del 50% de las alteraciones de estas enzimas en población pediátrica (Vajro, Paoletta, Maggiore, & Giordano, 2013).
- Síntomas óseo-articulares. La osteopenia y la artritis han sido descritas en numerosas ocasiones como manifestaciones extradigestivas de la EC. La disminución de la densidad mineral ósea se ha descrito en un 30-40% de los casos no tratados de EC, tanto en niños como en adultos, incluso en ausencia de síntomas de malabsorción. Aunque los mecanismos de las alteraciones del metabolismo mineral óseo en estos pacientes está poco estudiado, algunos datos demuestran que la EC es más común en personas con osteoporosis que en personas sin problemas óseos, encontrando que hasta un 4% de pacientes con osteoporosis presentan marcadores serológicos específicos de EC positivos (Kamycheva, Goto, & Camargo, 2016; Singh & Garber, 2016).

- Afectación neurológica y neuropsiquiátrica. Clásicamente, se han asociado algunas manifestaciones neurológicas específicas con la EC, principalmente la ataxia, que aparece en un 30-40% de los pacientes diagnosticados. Algunos autores, demostraron que un 57% de los pacientes con enfermedades neurológicas de causas desconocidas, presentaban niveles elevados de anticuerpos específicos de EC y llegaron a estimar una prevalencia de la enfermedad en este grupo del 16% (Hadjivassiliou et al., 2010). En cuanto a las afectaciones neuropsiquiátricas, las más frecuentes son: irritabilidad, cambio brusco de carácter y depresión, que desaparecen rápidamente tras la eliminación del gluten (Jackson et al., 2014; Urban-Kowalczyk, OEmigielski, & Gmitrowicz, 2014).
- Otras manifestaciones: defectos en el esmalte dental, trastornos reproductivos, abortos de repetición, disqueratosis (Pinto-Sanchez, Bercik, Verdu, & Bai, 2015).

3.2 Enfermedad celiaca silente

La EC silente es la que cursa con lesiones típicas en la mucosa intestinal, atrofia vellositaria que se recupera tras el seguimiento de la dieta sin gluten (DSG), pero que no refieren manifestaciones clínicas o mínimas (Ludvigsson et al., 2013). El diagnóstico de estos casos suele ser casual, fruto de estudios o estrategias de despistaje realizadas en población de riesgo: familiares de celíacos de primer grado o pacientes con patologías asociadas a EC (déficit de IgA, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide, Síndrome de Down) (Farrell & Kelly, 2002).

Aunque esta forma de presentación se ha considerado clásicamente como característica de la edad adulta, cada vez son más los estudios que apuntan a que la EC silente puede aparecer en edades tempranas (Gokce & Arslantas, 2015).

3.3 Enfermedad celiaca latente

La EC latente, es el término más controvertido. En la literatura se pueden encontrar hasta 5 definiciones: 1) pacientes con serología positiva y mucosa normal o ausencia de atrofia vellositaria; 2) pacientes con mucosa normal, con dieta normal pero que han tenido en algún momento una ligera atrofia vellositaria; 3) para algunos expertos esta forma de EC es simplemente una EC sin diagnosticar; 4) para otros expertos, la EC latente es una EC que va precedida de otras enfermedades autoinmunes (diabetes, tiroides); 5) finalmente otros autores consideran la EC latente para referirse a sujetos con serología negativa, mucosa normal pero un aumento de linfocitos intraepiteliales (LIE). Así que, considerando que la EC latente y la EC potencial, descrita a continuación, suelen referirse a los mismos casos y resulta confuso, muchos autores desaconsejan el uso del término EC latente (Reilly et al., 2011; Reilly & Green, 2012; Ludvigsson et al., 2013).

3.4 Enfermedad celiaca potencial

La EC potencial es la que se encuentra en la base del Iceberg. En estos casos, no se encuentran alteraciones histológicas importantes en la biopsia intestinal ni tampoco síntomas, tan solo se observan o bien un ligero aumento de linfocitos intraepiteliales y marcadores serológicos

positivos transitorios. Algunos casos también son positivos para HLA-DQ2 y pueden o no presentar síntomas. En estos casos, recomienda hacer un seguimiento clínico y serológico (Lionetti et al., 2012).

A continuación, la **Tabla 1** muestra las principales diferencias en cuanto a la sintomatología, serología e histología de la EC clásica, silente, latente y potencial.

Tabla 1. Principales diferencias entre la EC clásica, silente, latente y potencial.

	EC clásica	EC silente	EC latente	EC potencial
Sintomatología	+	-	- / +	-
Marcadores Serológicos	+	+	-	+
Lesión intestinal (biopsia)	+	+	-	- / +
Marcadores genéticos	+	+	+	+

3.5 Enfermedad celiaca refractaria

La EC refractaria se considera cuando, tras 12 meses de dieta estricta sin gluten, persiste la atrofia vellositaria e hiperplasia de criptas, o bien cuando la clínica es grave y es necesaria la reevaluación del paciente. Aunque la EC refractaria es considerada como una enfermedad rara, se diagnostica hasta en un 5% de los celíacos (Rishi, Rubio-Tapia, & Murray,

2016). Se describe con más frecuencia en mujeres, en personas mayores de 50 años y muy rara vez se ha diagnosticado en menores de 30.

Los síntomas más frecuentes son la diarrea crónica, dolor abdominal persistente y pérdida de peso asociado a malabsorción y anemia. A nivel histológico, se encuentra que la atrofia de las vellosidades continúa, así como la hiperplasia de las criptas y aumento de los LIE (Woodward, 2016).

Cuando hay sospecha de un paciente celiaco que no responde a la dieta sin gluten, lo primero que hay que plantearse es si realmente el diagnóstico de celiaquía está bien hecho y no se trata de otra patología. Existen una serie de enfermedades que pueden cursar con atrofia de las vellosidades intestinales, como giardiasis, Enfermedad e Whipple, gastroenteritis eosinofílica, enteropatía por VIH, linfoma intestinal, Síndrome de Zollinger-Ellison, Enfermedad de Crohn, etc (Rubio-Tapia & Murray, 2010). En segundo lugar, hay que asegurarse que el paciente cumple estrictamente la dieta, ya que en muchas ocasiones es la causa más frecuente de la falta de respuesta al tratamiento, que no se sigue estrictamente como asegura el paciente. En tercer lugar, hay que asegurarse que la falta de respuesta al tratamiento no es debido a otros procesos asociados a la EC, como intolerancia a la lactosa, insuficiencia pancreática, colitis microscópica, sobrecrecimiento bacteriano, linfoma T asociado a enteropatía, etc (Vivas Alegre & Ruiz de Morales, 2008).

Por lo tanto, se puede confirmar la EC refractaria cuando se demuestra que las lesiones de la mucosa persisten o se agravan junto con la sintomatología, pasados 6-12 meses del diagnóstico e inicio de la dieta sin gluten y tras haber descartado correctamente los diagnósticos descritos anteriormente (Rishi et al., 2016). Una vez diagnosticada la EC refractaria, se debe estudiar el fenotipo de los linfocitos de la mucosa intestinal para clasificar la EC refractaria de tipo I, en la que los LIE presentan un fenotipo normal, EC refractaria tipo II, en la que hay una proliferación monoclonal de los linfocitos y esta expansión aberrante es la que predispone al linfoma intestinal de tipo T asociado a la enteropatía. En el caso de la tipo I, el pronóstico puede mejorar aplicando tratamiento farmacológico con inmunosupresores y nutrición enteral, pero en cambio, en la tipo II, el linfoma no responde a este tratamiento y se recurre a la poliquimioterapia o incluso cirugía. En ambos casos, la supervivencia de estos pacientes a los 5 años está por debajo del 50% (Nijeboer, van Wanrooij, Tack, Mulder, & Bouma, 2013).

4. Etiopatogenia

Aunque la etiopatogenia de la EC no ha sido claramente establecida, lo que está bien estudiado es que es una enfermedad multifactorial, en la que concurren factores genéticos, sistema inmune y factores ambientales (**Figura 2**).

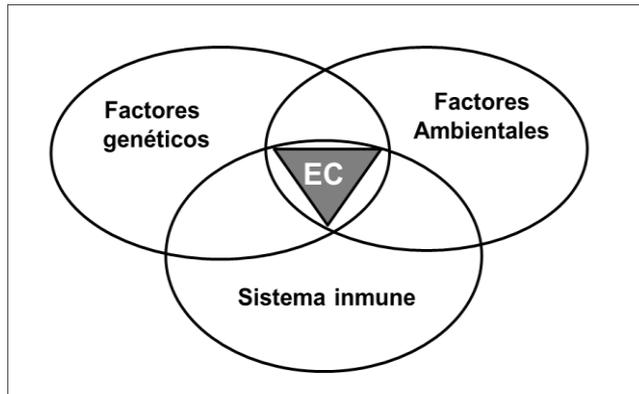


Figura 2. Esquema de la etiopatogenia de la enfermedad celiaca

4.1 Factores genéticos

La existencia del componente genético de la EC quedó demostrada en los estudios realizados en gemelos monozigóticos en los años 70. Fue en esta época, cuando se relacionó por primera vez la EC con el sistema HLA (Falchuk y Strobes, 1972; Stokes, 1972). La correlación se estableció en base a dos observaciones claves:

- La frecuencia con la que se daba la EC en familiares de primer grado (padres / hermanos) de un paciente con EC era mayor que en individuos no emparentados. Actualmente, esta frecuencia se estima en un 10% en familiares de primer grado frente al 1% de la población general (Singh, Arora, Lal, Strand, & Makharia, 2015).
- La concordancia entre gemelos monozigóticos era muy superior a la de hermanos dizigóticos. Actualmente, se estima que esta concordancia es del 70-80% en los primeros y un 11% en los

segundos (Greco et al., 2002). Además, los valores de riesgo relativo entre hermanos son el indicio más evidente de que la EC tiene un agrupamiento familiar, teniendo en cuenta la prevalencia en la población general sin familiares celíacos (Nistico et al., 2006).

4.1.1 El sistema HLA

Está demostrada la fuerte asociación entre la EC y el sistema HLA. Este sistema está compuesto por un conjunto de genes denominados genes de histocompatibilidad, que se localizan en el cromosoma 6, en la región 6p21.

Los genes del sistema HLA se clasifican en tres regiones diferentes, clase I, II y III. Los productos de los genes de las dos primeras clases, I y II, aunque son moléculas diferentes, pertenecen a las familias de las inmunoglobulinas e intervienen en procesos de activación y restricción de la respuesta de los linfocitos T. Principalmente, estos genes, codifican unas moléculas que son glicoproteínas de membrana, que se expresan en la superficie de las células humanas y cuya función principal es la de distinguir moléculas propias del individuo de moléculas ajenas, presentando antígenos peptídicos a los linfocitos T (Wolters & Wijmenga, 2008).

Por otro lado, los genes que integran la región de la clase III, codifican moléculas del sistema inmunitario innato y del factor de necrosis tumoral.

La EC se ha asociado principalmente a los genes HLA de clase II, agrupándose en la denominación HLA-D. Dentro de esta denominación, se distinguen 5 familias o isotipos: DM, DO, DP, DQ y DR. Por otro lado, la región que abarcan los genes HLA se ha denominado **CELIAC1** (Figura 3). Estas 5 familias a su vez, presentan dos *loci* (posiciones fijas en el cromosoma), A y B (Koning, 2012).

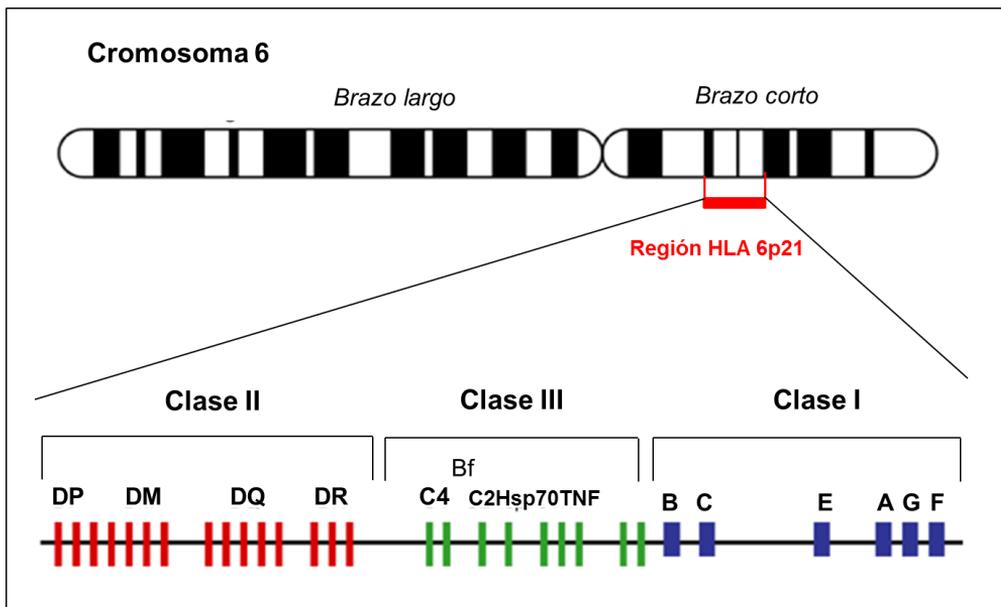


Figura 3. Esquema del sistema HLA.

Cada individuo hereda un conjunto de 2 alelos, uno del padre y otro de la madre, y cada juego completo de alelos heredados de un progenitor, se denomina haplotipo. Es decir, el genotipo HLA de cada individuo está formado por la suma del haplotipo del padre (con sus alelos correspondientes) y del haplotipo de la madre (con sus alelos

correspondientes). Cabe destacar dos peculiaridades del sistema HLA. Por un lado, existe lo que se conoce como un desequilibrio de ligamiento, ya que hay ciertas combinaciones de variantes alélicas que se dan con mayor frecuencia de la que cabría esperar si la asociación fuera al azar. Y por otro, que el sistema HLA es altamente polimórfico y cada uno de los genes contiene un gran número de alelos. Debido a ese gran polimorfismo, la mayoría de la población es heterocigota para el sistema HLA completo, sin embargo algunos individuos pueden ser homocigotos para uno o más alelos también (Neefjes, Jongtsma, Paul, & Bakke, 2011).

La inmunogenética del sistema HLA en la EC

De los 5 isotipos de HLA de clase II, se ha comprobado que la susceptibilidad a la EC reside principalmente en el HLA-DQ, expresada en el 95-99% de los casos de EC. En concreto, la molécula DQ2 es la que confiere mayor riesgo, presente hasta en el 90% de los casos de EC. El resto de pacientes EC pero negativos para DQ2, son portadores de la molécula DQ8 (Trynka, Wijmenga, & van Heel, 2010).

- **HLA-DQ2**

El heterodímero DQ2 puede ser codificado en por los alelos de riesgo DQA1*05:01 y DQB1*02:01, que dan lugar al haplotipo DQ2.5, siendo este el haplotipo asociado a mayor riesgo de celiaquía. Este haplotipo, a su vez, va asociado al gen DR3 (más común en el centro y norte de Europa).

Pero este heterodímero también puede ser codificado a su vez por los alelos DQA1*02:01 y DQB1*02:02, que dan lugar al haplotipo DQ2.2, de riesgo pero menor que el anterior (DQ2.5). Este haplotipo, a su vez, va asociado al gen DR7 (más común en la cuenca mediterránea). Cuando este gen se asocia en trans a la molécula DR5, codificado por DQB1*03:01, DQA1*05:05, da lugar al genotipo DQ2.2/DQ2.7. Esta asociación es muy característica y común también de la cuenca mediterránea.

Esta asociación es importante a nivel inmunopatogénico de la EC, puesto que numerosos estudios han demostrado que la molécula DQ2 es la principal presentadora de los epitopos tóxicos del gluten a los linfocitos T de la mucosa intestinal. De modo que, ser portador en homocigosis del haplotipo DQ2.5 (DQ2.5/DQ2.5) o ser heterocigoto (DQ2.5/DQ2.2), confiere una susceptibilidad significativamente superior de ser celiaco que siendo portador de alguno de estos haplotipos en heterocigosis (DQ2.5/X y DQ2.2/X) (Dubois et al., 2010; Pisapia et al., 2016).

- **HLA-DQ8**

Si bien el 90% de los afectados de EC son portadores de los haplotipos DQ2.5 y/o DQ2.2, existe un pequeño porcentaje de individuos que son portadores del haplotipo denominado DQ8, ligado al gen DR4. Éste, está codificado por los alelos DQA1*03:01 y DQB1*03:02, que confiere un riesgo menor de desarrollo de EC frente a los otros dos haplotipos (Wolters & Wijmenga, 2008; Dieli-Crimi, Cénit, & Núñez, 2015).

Por último, cabe destacar que algunos autores observaron como las mujeres son portadoras de las moléculas HLA-DQ2/DQ8 de manera más frecuente que los hombres, estimando que solo el 0.9% de las mujeres celiacas eran negativas para ambas, frente al 9.5% de hombres negativos para las mismas (Megiorni et al., 2008). Este hallazgo podría explicar, en parte, la diferencia en la prevalencia entre mujeres (mayor) y hombres (menor) que se ha comentado previamente.

4.1.2 Otros genes no-HLA

Al genotipo HLA y en concreto a los heterodímeros HLA-DQ2/DQ8, se les atribuye hasta el 40% de la heredabilidad de la EC. Sin embargo, se sabe el cerca del 30% de la población sana de origen caucásico es portadora de alguno de los haplotipos de riesgo citados, pero menos del 2% acaban desarrollando EC. Por otro lado, los estudios de concordancia entre hermanos con HLA idéntico, revelan que ésta es solo del 30%. Estos datos sugieren que el genotipo DQ es necesario para el desarrollo de EC pero no suficiente para desencadenarla y que es posible que exista una acumulación de riesgos por intervención de otros muchos genes de menor acción (Romanos & Wijmenga, 2010).

Durante la última década, se han llevado a cabo numerosos estudios para intentar localizar aquellos genes que confieren susceptibilidad pero situados fuera de la región HLA y que puedan explicar la otra parte de la genética de la EC. Por un lado, se han llevado a cabo estudios de ligamiento en familias y estudios de asociación. Estos estudios han dado

lugar a la localización y definición de **regiones CELIAC**, definidas como aquellas regiones cromosómicas que se repiten y se heredan por los afectados de EC en varias generaciones de una familia y en las que se han encontrado cierta asociación con polimorfismos genéticos que actuarían como factores de riesgo y contribuirían al otro 60% de la carga genética que falta por determinar. Y por otro lado, y más recientemente, se han realizado estudios de asociación de genoma completo, GWAS, (por sus siglas en inglés, *Genome Wide Association Studies*), que han permitido el análisis de miles de polimorfismos de un único nucleótido, SNPs (por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*), que son variaciones en la secuencia del ADN que afecta a una sola de las bases (adenina, timina, citosina o guanina) de una secuencia del genoma humano.

- **Estudios de ligamiento y asociación: regiones CELIAC**

Estos estudios realizados en familias han permitido identificar regiones cromosómicas repetidas a lo largo de varias generaciones y se han podido acotar aquellas regiones del genoma que tienen una implicación potencial en la patogénesis de la EC. Aunque no todos los estudios realizados han sido concluyentes y se necesitarían más estudios en diferentes poblaciones, hasta la fecha, se han identificado cuatro regiones candidatas en las que los genes hallados podrían tener un papel en el desarrollo de la enfermedad:

CELIAC1: esta región, situada en el cromosoma 6, posición 6p21, es la que alberga los genes del sistema HLA clase II, que constituye el componente genético más relevante de la EC y cuyos resultados han sido los únicos reproducidos en todos los estudios poblacionales realizados hasta el momento (Dubois et al., 2010).

CELIAC2: esta región situada en el cromosoma 5, posición 5q31-33, fue descrita por primera vez en 1998 por Greco y colaboradores en una población italiana (Greco et al., 1998). En esta región se han identificado un grupo de genes implicados en la activación y diferenciación de linfocitos T y genes que codifican para algunas citoquinas que pueden ser importantes en la regulación del sistema inmune y la inflamación (Greco et al., 2001). Sin embargo, aunque los estudios de ligamiento han dado resultados positivos en numerosas poblaciones, actualmente no se ha identificado ningún gen concreto en esta región asociado a la EC.

CELIAC3: esta región, situada en el cromosoma 2, posición 2q33, descrita por primera vez en 1999 (Holopainen et al., 1999), es la región no HLA más destacable en cuanto a la reproducibilidad de los resultados obtenidos en diferentes estudios. Aquí, se han encontrado genes reguladores de la respuesta linfocitaria, unos que producen la proliferación y activación de citoquinas y otro gen que inhibe la respuesta del linfocito. Sin embargo, aunque muchos estudios encuentran asociación de esta región con el desarrollo de EC (Popat et al., 2002; Haimila et al., 2004), otros estudios no lo confirman (Dema et al., 2009;

Song, Kim, Kim, & Lee, 2013), por lo tanto, el factor genético que confiere el riesgo en la región CELIAC3, todavía no ha sido identificado.

CELIAC4: por último, en esta región situada en el cromosoma 19, que fue identificado en el año 2003 por el grupo de Belzen (Van Belzen et al., 2003), se ha identificado un gen candidato, el MYO9B. Se ha hipotetizado que las variaciones en este gen, por sus características y función, pueden suponer la disrupción de la barrera intestinal que permitiría el paso de péptidos inmunogénicos, como los del gluten (Monsuur et al., 2005; Curley, Monsuur, Wapenaar, Rioux, & Wijmenga, 2006). Si bien es cierto que, al igual que en las regiones anteriores, no todos los estudios de asociación realizados, han encontrado asociación positiva con este gen (Giordano et al., 2006; Nunez et al., 2006; Capilla et al., 2007), esta región contiene 140 genes que podrían ser buenos candidatos por su implicación en la inmunidad y en la inflamación (Curley et al., 2006).

- **Estudios de asociación del genoma completo: GWAS**

Los GWAS permiten un rápido escaneo del genoma de los individuos, y se realizan con el objetivo de encontrar marcadores de variaciones genéticas asociadas a una enfermedad, en el caso de la EC, se buscan polimorfismos de un único nucleótido (SNPs).

En el primer estudio del genoma completo realizado en EC, se compararon 778 individuos con EC frente a 1.422 controles sanos, realizándose análisis de asociación de 310.605 SNPs. El único SNP fuera de la región HLA en demostrar asociación significativa estaba en la región

de los genes IL2 e IL21 (van Overbeek et al., 1997; van Heel et al., 2007;).

En el segundo estudio de GWAS, realizado en 2009, se analizaron 292.387 SNPs fuera de la región HLA en muestras de ADN de 4.533 individuos con EC y 10.750 controles sanos de Europa. En este segundo análisis, se identificaron 13 nuevas regiones de riesgo, con evidencias significativas de asociación, que albergaban genes con funciones inmunológicas (Dubois et al., 2010).

El último proyecto llevado a cabo con el objetivo de identificar un mayor número de variantes asociadas a la EC, fue el denominado Immuchip, en el que se analizaron más de 200.000 variantes en 12.000 individuos con EC y 12.000 controles, procedentes de 7 regiones geográficas diferentes. Esta técnica permitió realizar genotipado más denso, aunque muchos de los genes encontrados con posible relación con la EC, ya habían sido descritos en los estudios de GWAS (Trynka et al., 2011).

Con todos estos estudios, lo que está claro es que a pesar de las décadas de investigación en la EC, los mecanismos genéticos exactos que subyacen a esta enfermedad, siguen sin estar del todo claros. A pesar de ello, como se muestra en la **figura 4**, desde los inicios, los GWAS y estudios posteriores, han comenzado a esclarecer la dimensión y contribución de la genética en la enfermedad, y con el tiempo, estas variantes genéticas podrán incluirse en algoritmos de predicción de riesgo para permitir un diagnóstico previo a la aparición de síntomas, en

individuos con alta predisposición genética (Kumar, Wijmenga, & Withoff, 2012). Por último, los hallazgos de estos genes, siguen sin explicar el 100% de la etiopatogenia de la EC, lo que sugiere que otros factores individuales y/o ambientales, son necesarios para el desarrollo de la enfermedad.

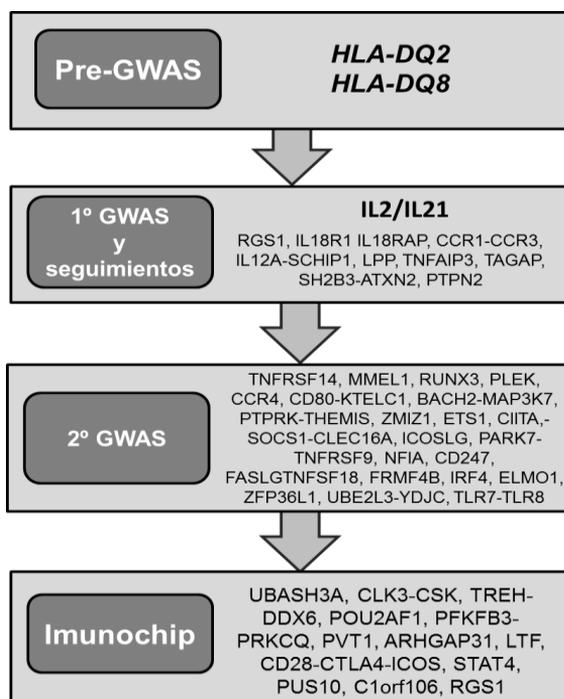


Figura 4. Historia de la genética de la enfermedad celiaca. Técnicas utilizadas y genes potencialmente relacionados con la enfermedad, hallados con cada técnica. GWAS, Genome Wide Association Studies.

4.2 Factores inmunológicos

La EC ha sido descrita como una enfermedad autoinmune, considerando ésta como aquella enfermedad en la que el sistema inmune actúa contra componentes propios del organismo y del individuo, convirtiéndose en su propio atacante. En el caso de la EC, el sistema inmune reacciona frente a la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten sin digerir, la gliadina, que pasan desde la luz intestinal hasta la lámina propia y son modificados por la transglutaminasa tisular 2 (TGt 2) (Sollid & Jabri, 2013). La TGt 2 es una enzima calcio-dependiente con múltiples funciones y localizaciones en el organismo. Cuando la gliadina atraviesa la barrera intestinal, la TGt 2 deamina la glutamina a ácido glutámico, confiriéndole cargas negativas a esta molécula. Esta reacción facilita la unión de la gliadina deamidada a las moléculas HLA de las células presentadoras de antígenos, que estimulan los linfocitos T y que da lugar a la cascada inmunológica que sucede a continuación y que se describe en la figura 5 (Stepniak & Koning, 2006; Elli, Bergamini, Bardella, & Schuppan, 2009).

En condiciones fisiológicas normales, la gliadina no puede atravesar la barrera intestinal que forman las células epiteliales. Estas células están unidas por *tight junctions*, o “uniones estrechas” que limitan el paso de macromoléculas al espacio de la lámina propia y hacen que el epitelio tenga una permeabilidad selectiva. Sin embargo, se cree que en individuos susceptibles, la interacción entre la gliadina y las células epiteliales da lugar a la alteración de las *tight junctions*, y por lo tanto, a la

alteración de la barrera intestinal. También, se sabe que la enzima zonulina es una proteína capaz de inducir el desensamblaje de las *tight junctions*. Se ha visto que en la fase activa de la enfermedad, su producción es continua y se encuentra en mayor cantidad que en individuos sanos (Fasano et al., 2000).

Por otro lado, recientes estudios han demostrado que, en individuos genéticamente susceptibles, los péptidos del gluten pueden inducir una respuesta inmunológica no solo a través de la unión de los péptidos a las moléculas HLA y estimulación de los linfocitos T, sino que ciertas fracciones del gluten también pueden inducir la producción de interleuquina 15 (IL-15) en células mononucleares de la lámina propia de pacientes susceptibles (Koning, Schuppan, Cerf-Bensussan, & Sollid, 2005). Esta IL-15, a su vez, estimularía la expresión de moléculas MIC en el intestino que interactúan con los receptores de los linfocitos *Natural Killer (NK)* NKG2D (Hüe et al., 2004; Stepniak & Koning, 2006).

Aunque los mecanismos moleculares que desencadenan la EC no están completamente descritos actualmente, se sabe que existen una serie de reacciones que dan lugar a la destrucción de las vellosidades intestinales y por lo tanto al aumento de la permeabilidad intestinal característica de la EC (**Figura 5**) (Sollid, 2000).

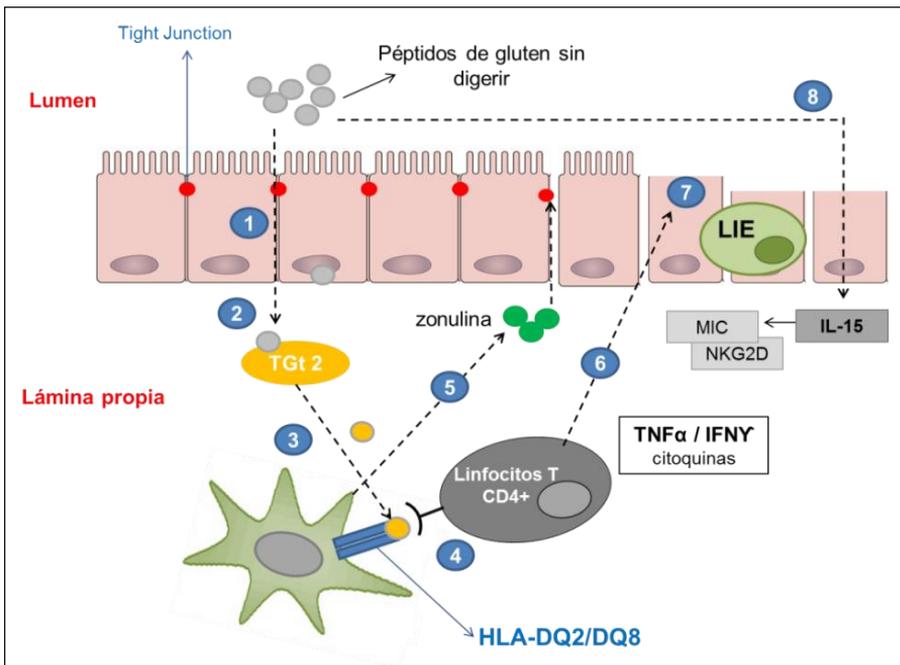


Figura 5. Esquema simplificado de la etiopatogenia de la enfermedad celiaca. (1) Los péptidos del gluten sin digerir, la gliadina, atraviesan la barrera intestinal. (2) Una vez atravesada la barrera, se une al enzima TGt 2, que deamida la molécula. (3) La molécula de gliadina deamidada, con carga negativa, se une al complejo HLA-DQ2/DQ8 presente en células presentadoras de antígenos, normalmente células dendríticas. (4) La célula dendrítica presenta esta unión a los linfocitos T CD4+. (5) A su vez, la unión de la gliadina deamidada al HLA estimula la producción de la zonulina que aumenta la permeabilidad intestinal mediante la ruptura de las “tight junction”. (6) La estimulación de los linfocitos T, produce la liberación de citoquinas, especialmente factor de necrosis tumoral (TNF α) e interferón (IFN γ); (7) ambas moléculas han demostrado tener un efecto citotóxico en las células del epitelio intestinal, produciendo la atrofia vellositaria característica de la EC y aumento de la producción de LIE. (8) Por último, los péptidos del gluten también estimulan la producción de IL-15, que a su vez produciría, por un lado el aumento de los LIE y por otro, la producción de moléculas MIC y receptores NK; en concreto NKG2D, que inducen también la destrucción de las vellosidades intestinales.

4.3 Factores ambientales

Como se ha descrito en apartados anteriores, el 30% de la población sana de origen caucásico es portadora de alguno de los haplotipos de riesgo de EC citados, pero menos del 2% acaban desarrollando EC. Además, la concordancia entre hermanos con HLA idéntico es solo del 30%, lo que sugiere que además de la genética es necesaria la implicación de factores ambientales para desencadenar la enfermedad. En los últimos años ha cobrado especial interés la posible influencia de algunos factores ambientales concretos en el desarrollo de la EC.

4.3.1 El gluten

Es la proteína de conservación más importante que se encuentra en el endospermo de los cereales de la familia *Triticeae*, como el trigo, la cebada y el centeno, con propiedades aglutinantes que proporcionan efectos deseables desde el punto de vista tecnológico. Las proteínas del gluten representan entre un 80–85 % del total de las proteínas de estos cereales. El caso de la avena, sigue siendo controvertido, actualmente se considera un cereal tóxico para los celíacos debido a la posible contaminación cruzada que puede presentar con trigo, cebada o centeno. Aunque a nivel taxonómico, la avena pertenece a la familia *Aveneae*, algunos autores han encontrado secuencias de aminoácidos que podrían ser tóxicas en el caso de la EC (Arentz-Hansen et al, 2004a; Silano et al., 2007).

A nivel estructural, el gluten a su vez es un conjunto de proteínas que se puede clasificar en dos grupos: **prolaminas** (solubles en etanol), con alto contenido en los aminoácidos prolina y glutamina, y las **gluteninas** (insolubles en etanol). Actualmente, se sabe que la EC está causada principalmente por la intolerancia a las prolaminas, pero también se han encontrado fracciones tóxicas en las gluteninas. Las prolaminas del gluten son: gliadinas en el caso del trigo, secalinas en el centeno y hordeína en la cebada (**Figura 6**) (Shewry & Halford, 2002; Wieser, 2007).

Las **gliadinas** son proteínas monoméricas que se clasifican en cuatro grupos, según su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida a pH ácido: α , β , γ , ω - gliadinas. En cambio, las gluteninas, son proteínas poliméricas que se clasifican según su peso molecular: gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) y gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GS) (Shewry & Halford, 2002; Shewry, Halford, & Lafiandra, 2003; Belton, 2005).

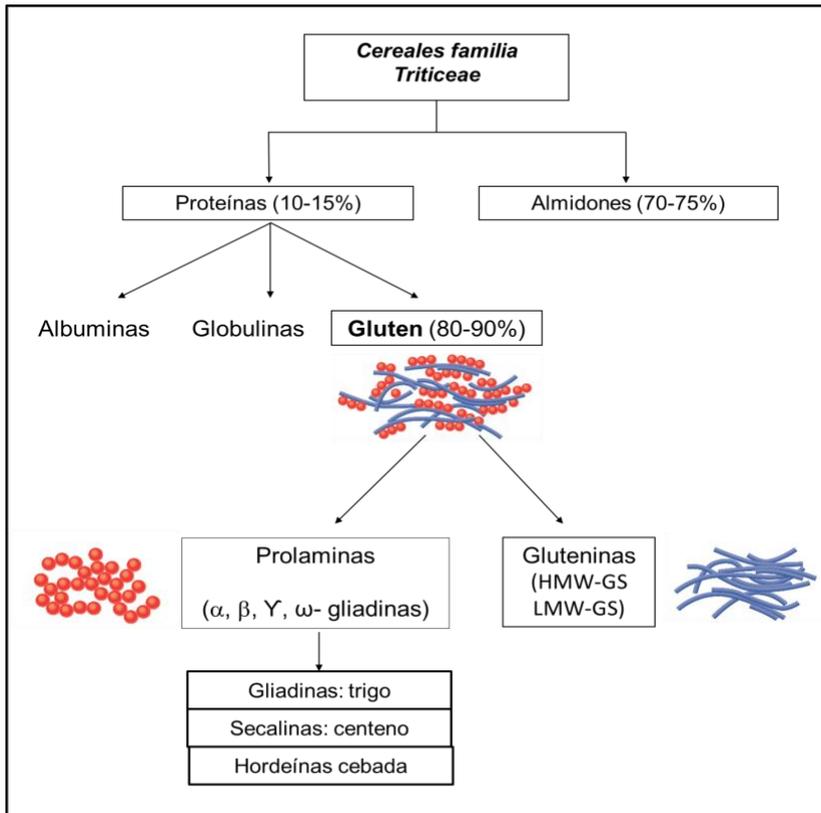


Figura 6. Esquema de la composición de los cereales de la familia Triticeae.

Las enzimas digestivas, están preparadas para degradar las proteínas hasta su nivel más básico, los aminoácidos. Primero se rompen en péptidos (cadenas cortas de aminoácidos) y finalmente estos péptidos se degradan hasta dejar sueltos los aminoácidos. Estas moléculas son las que se absorben en el intestino para su aprovechamiento. Todas las proteínas que ingerimos pueden ser degradadas hasta su nivel más básico, excepto una, el gluten, que debido a su particular estructura primaria, hace que resulte casi imposible digerir esta proteína en su totalidad. Mientras que una proteína normal es capaz de degradarse en

aminoácidos y absorberse en 6 horas, los derivados del gluten pueden resistir la digestión hasta 24 horas, un ejemplo más de su complejidad.

De modo que el producto final de la digestión del gluten que llega al intestino, no son aminoácidos, sino una mezcla de péptidos (macromoléculas), que en condiciones fisiológicas normales, las células epiteliales son casi impermeables a este tipo de moléculas. Sin embargo, en el caso de la celiaquía, estos péptidos son citotóxicos, ya que la permeabilidad intestinal y la integridad de las uniones estrechas de las células están alteradas y se permite el paso de estos péptidos que desencadenan la respuesta inmunitaria descrita en el apartado anterior.

Pero no todos los péptidos derivados de la digestión del gluten son tóxicos en el caso de la enfermedad celiaca. Actualmente, se han identificado más de 50 péptidos (secuencias de aminoácidos) que pueden instigar la enfermedad, aunque del que más evidencia hay, como uno de los más tóxicos para la EC, es el **péptido 33-mer**, derivado de la α -gliadina. Se considera uno de los péptidos más tóxicos porque contiene 6 epitopos de linfocitos T (porción de la molécula que es reconocida por el sistema inmune), y resiste totalmente a la degradación enzimática gástrica y pancreática, llegando intacto a la mucosa intestinal (Shan et al., 2002; Nikulina, Habich, Flohe, Scott, & Kolb, 2004).

4.3.1.1 Edad de introducción del gluten y lactancia materna.

La edad de introducción de gluten en lactantes de riesgo y la lactancia materna, han sido unos de los factores ambientales considerados clave en el desarrollo de la EC, hasta hace relativamente poco. La evidencia epidemiológica más firme relacionada con este factor, procedía de estudios retrospectivos observacionales, basados principalmente en la llamada Epidemia Sueca (Ivarsson et al., 2000). Entre los años 1984 y 1996, se detectó en Suecia un aumento, considerado epidémico, de casos de EC en niños menores de 2 años, con una incidencia 4 veces superior a la esperada. Debido a que fueron los menores de 2 años los principales afectados, se consideró que las prácticas en la alimentación temprana podrían estar implicadas en este incremento de casos. Analizando los posibles factores, se detectó que en Suecia, a principio de los años 80, habían entrado en vigor nuevas recomendaciones de introducción de gluten a nivel nacional, que posponía la introducción de los 4 años a los 6 meses, edad que además coincidía en muchas ocasiones con el cese de la lactancia materna. Además, se descubrió que durante los años de la epidemia, se había incrementado el consumo de gluten durante los primeros meses de vida, debido a que se había aumentado el consumo de bebidas malteadas y cereales infantiles y había disminuido el número de niños que tomaban lactancia materna a los 6 meses. Por otro lado, el cese de la epidemia, a partir de 1995, coincidió con otro cambio en las recomendaciones alimentarias que

consistía en volver a introducir el gluten entre los 4 y 6 meses de forma gradual, preferiblemente mientras se daba lactancia materna, y se observó también, una disminución en la cantidad de gluten consumida. De modo que la llamada Epidemia Sueca de EC, se atribuía principalmente a los cambios en edad de introducción de gluten, el aumento del consumo de gluten durante los primeros años de vida y la disminución de la duración de la lactancia materna (Ivarsson et al., 2000; Ivarsson, Hernell, Stenlund, & Persson, 2002; Akobeng, Ramanan, Buchan, & Heller, 2006).

Posteriormente, en 2005, el grupo de Norris et al, publicó otro estudio también observacional y retrospectivo, realizado en 1.560 pacientes con riesgo genético de desarrollar EC (diabéticos y familiares de primer grado de pacientes con EC), en el que concluían que el riesgo de desarrollar EC era mayor cuando se introducía el gluten antes de los 3 meses o después de los 7 meses (Norris et al., 2005). Este estudio, junto con los datos de la cohorte sueca, planteaban la hipótesis de que la introducción entre los 4 y 6 meses de edad podría ser una ventana de oportunidad en prevención de la EC, induciendo la tolerancia oral al gluten en pacientes de riesgo.

Paralelamente a estos estudios, se publicaron una serie de análisis y revisiones, que afirmaban que introducir el gluten mientras se daba lactancia materna, en aquellos sujetos de riesgo, reducía significativamente el desarrollo de EC (Anderson & Brueton, 1985; Fälth-Magnusson, Franzen, Jansson, Laurin, & Stenhammar, 1996; Ascher,

Krantz, Rydberg, Nordin, & Kristiansson, 1997; Peters, Schneeweiss, Trautwein, & Erbersdobler, 2001; Persson, Ivarsson, & Hernell, 2002; Sollid, 2002; Akobeng et al., 2006).

De modo que todos los datos de anteriores dieron lugar, por un lado a la puesta en marcha de estudios prospectivos diseñados específicamente para comprobar esta hipótesis. Y por otro, a la elaboración de nuevas recomendaciones del Comité de Alimentación Complementaria de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN, por su siglas en inglés) publicadas en 2008 que, en base a los datos disponibles hasta ese momento, establecían que para reducir el riesgo de desarrollo de EC en población de riesgo, el gluten no debía introducirse antes de los 4 meses ni después de los 6, y debía introducirse preferiblemente mientras se daba lactancia materna (Agostoni et al., 2008).

Sin embargo, la hipótesis de la ventana de oportunidad, ha sido recientemente descartada por varios estudios. El primer estudio realizado en una cohorte sueca, fue el estudio ETICS (*Exploring the Iceberg of Celiacs in Sweden*), realizado entre 2005 y 2010 (Myleus et al., 2009; Naggara et al., 2011; Ivarsson et al., 2012; Namatovu, Sandström, Olsson, Lindkvist, & Ivarsson, 2014). En este estudio se evaluaron retrospectivamente dos cohortes de pacientes de 12 años de edad, por un lado los que nacieron en 1993 (durante la epidemia) y los que nacieron posteriormente, y que por tanto habían introducido el gluten a diferentes edades. Los resultados de este estudio revelaron que, la

prevalencia de casos de EC en la población nacida durante la epidemia era casi del 3%. Sin embargo, también se vio que dos tercios de los niños nacidos durante los años posteriores a la epidemia, se habían diagnosticado más tarde de los 2 años. Por lo que los autores concluyen que probablemente la disminución de los casos de EC después de la epidemia en niños menores de 2 años se debía, más que a una verdadera disminución de la incidencia, a un retraso en el desarrollo de la clínica, y por lo tanto que los niños nacidos después de la epidemia se diagnosticaban a edades más tardías (**Figura 8**). Los investigadores también observaron que la incidencia acumulada era incluso superior a la cohorte epidémica a edades a edades similares, y concluyen en la posible presencia de otros factores de riesgo que se presenten de forma cíclica tanto a nivel ambiental como de estilos de vida (Ivarsson, 2005; Ivarsson et al., 2012).

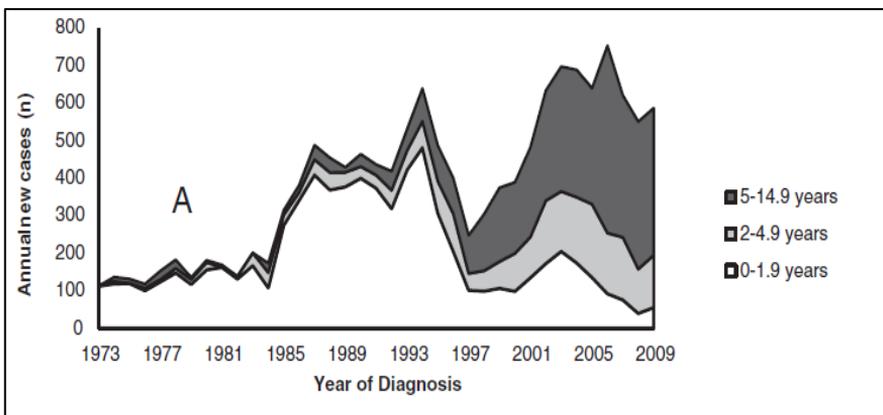


Figura 8. El número estimado de nuevos casos de EC anualmente en la población infantil sueca durante el período comprendido entre 1973 y 2009.

Figura obtenida de (Namatovu et al., 2014)

Otro de los estudios que ha descartado la hipótesis de la ventana de oportunidad ha sido el CELIPREV (*Risk of Celiac Disease and Age at Gluten Introduction*), estudio multicéntrico, aleatorizado realizado en una cohorte italiana de 707 lactantes con riesgo genético. En este estudio, los sujetos se aleatorizaron para iniciar la introducción de gluten a los 6 meses (grupo A) o a los 12 meses (grupo B). Los resultados mostraron que aunque a los 2 años, la incidencia de EC fue mayor en el grupo A (12% vs 5%), a los 5 años, estas diferencias ya no fueron significativas (16% vs 16%). Tampoco, ninguna de las otras variables estudiadas, incluyendo la duración de la lactancia materna, tuvieron un efecto preventivo en el desarrollo de la enfermedad. Por último observaron que la incidencia fue mayor en los niños con genotipos de alto riesgo (HLA-DQ homocitog). Por lo tanto, los autores concluyen que aunque el momento de introducción del gluten no tiene un impacto significativo en el desarrollo de EC, parece que la introducción tardía se asocia a un desarrollo más tardío también de la enfermedad, independientemente de la duración de la lactancia materna (Lionetti et al., 2014).

Finalmente, el tercer estudio prospectivo que contrastó esta hipótesis y del que se hablará más adelante también, fue el estudio europeo PreventCD. En este estudio multicéntrico, randomizado, de doble ciego, en el que participaron 7 países europeos, se incluyeron 944 recién nacidos con riesgo genético y se aleatorizaron, unos recibieron diariamente gluten entre los 4 y 6 meses y otros placebo, preferiblemente mientras recibían lactancia materna. Los resultados mostraron que, a los

3 años de edad, la incidencia de EC fue similar entre ambos grupos, los que recibieron gluten (5,9%) y los que recibieron placebo (4,5%). La lactancia materna tampoco mostró influencia en el desarrollo de la enfermedad, no hubo diferencias entre aquellos niños que no recibieron lactancia materna, ni los que tuvieron lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses o más, ni entre los que tuvieron lactancia mixta. Finalmente, igual que en la cohorte del CELIPREV, los autores confirmaron que la EC fue significativamente más frecuente en el grupo de sujetos homocigotos, y también en niñas (Vriezinga et al., 2014).

Respecto a la lactancia materna, además de los estudios descritos, una serie de revisiones sistemáticas y metaanálisis, han demostrado la falta de evidencia como para afirmar que la lactancia materna exclusiva reduce el riesgo de desarrollo de EC en lactantes con riesgo genético, o retrasa la aparición de los síntomas, en comparación con el uso de fórmulas artificiales o de lactancia mixta (Szajewska et al., 2015).

Todos estos nuevos resultados y evidencias han dado lugar a la actualización de las recomendaciones, a nivel nacional y europeo. Estas nuevas recomendaciones indican, que no existe evidencia suficiente para establecer una edad adecuada de introducción del gluten para prevenir la EC, y que ésta puede hacerse entre los 4 y los 12 meses, desaconsejando su introducción antes de los 4. También destacan que, ni lactancia materna ni su duración, ni la introducción del gluten durante la misma, ejercen un papel protector frente al desarrollo de EC (Koninckx et al., 2015; Szajewska et al., 2016).

4.3.1.2 Cantidad de gluten

A priori, parece razonable pensar que la dosis de antígeno ingerido, en este caso el gluten, podría tener un efecto significativo en el desarrollo de la tolerancia oral al mismo. De hecho, los estudios clásicos citados anteriormente, sugerían que además de la edad de introducción del gluten y la duración de la lactancia materna, la ingesta de grandes cantidades de gluten durante los primeros años de vida, aumentaba el riesgo de desarrollo de EC (Ascher et al., 1997; Mitt & Uibo, 1998). De acuerdo a los datos procedentes de la cohorte de la epidemia sueca, obtenidos retrospectivamente, se consideró que había más casos de EC entre aquellos niños que habían consumido grandes cantidades de harinas con gluten (en torno a 38 g/ niño/día) durante los años de la epidemia, que entre aquellos que habían recibido cantidades medias o pequeñas (sobre 24 g/niño/día) (Ivarsson et al., 2000; Ivarsson et al., 2002; Myleus et al., 2009).

Sin embargo, igual que los estudios prospectivos recientes, han descartado las hipótesis de la edad de introducción y lactancia materna, respecto a la cantidad de gluten y su impacto en el desarrollo de la EC en población de riesgo, hay escasas publicaciones que aborden esta cuestión de manera prospectiva, y por lo tanto permitan establecer conclusiones concluyentes. El único estudio prospectivo reciente, realizado en la cohorte sueca de riesgo genético del estudio TEDDY, concluye que los casos de EC consumían mayores cantidades de gluten en la visita previa a la seroconversión de los anticuerpos (4,9 gramos),

que los controles (3,9 gramos) (Aronsson et al., 2016). Por lo que se necesitan más estudios prospectivos en cohortes más amplias que confirmen o descarten esta hipótesis.

4.3.2 El trigo

Dentro de los cereales que contienen gluten, el trigo es el que se consume en mayor cantidad. Además, es el tercer cereal con mayor producción mundial después del maíz y el arroz. El término trigo designa al conjunto de cereales, tanto cultivados como silvestres, del género botánico *Triticum*, perteneciente a la subfamilia *Poideae* de la familia de las gramíneas, que también incluye la cebada y el centeno (Snape & Pánková, 2007).

Durante toda su evolución, los cultivos de trigo han ido sufriendo procesos de hibridación natural y poliploidización que han supuesto modificaciones en su composición y genoma, dando lugar a diferentes especies (Chantret et al., 2005). Desde el punto de vista genético, hay diferentes tipos de trigo cultivado que se diferencian en el número de cromosomas. Las especies ancestrales (*Triticum monococcum*), raramente encontradas hoy en día, se consideran **diploides** con un genoma y 7 pares de cromosomas. Las especies diploides contienen el genoma A (*T. urartur*), el genoma B (*T. speltoides*) o el genoma D (*T. tauschii*, también conocido como *Aegilops squarrosa*). Los trigos diploides todavía se cultivan en algunos países de Europa (regiones montañosas de los Balcanes o sur de Italia), en Turquía y en la India, pero no a gran

escala, estos cultivos se encuentran en pequeñas y particulares explotaciones agrícolas (Dvořák, Terlizzi, Zhang, & Resta, 1993).

Las otras dos especies de trigo de importancia agrícola son, por un lado el *Triticum turgidum* (su subespecie / variedad *durum*), que es **tetraploide** (con dos genomas, AABB). Los datos disponibles, indican que esta especie se formó a partir de la hibridación y duplicación cromosómica espontánea de los genomas de las especies *T. urartur* y *T. speltoides*. El trigo durum (duro), también se conoce como trigo de la pasta, ya que en la mayoría de países, es el principal producto derivado de esta especie de trigo. Y por otro lado, está la especie *Triticum aestivum*, que es **hexaploide** (con tres genomas AABBDD), derivado de la hibridación de *T. turgidum* y la especie diploide portadora del genoma D, *T. tauschii*, (**Figura 9**) (Snape & Pánková, 2007). Esta especie, se conoce como trigo de panificación o trigo harinero, ya que por sus propiedades, es el tipo de trigo utilizado para la elaboración de pan y productos procesados a base de harina (cereales, galletas, bollería, etc). Ambas especies, suponen el 90% de todo el trigo producido en el mundo.

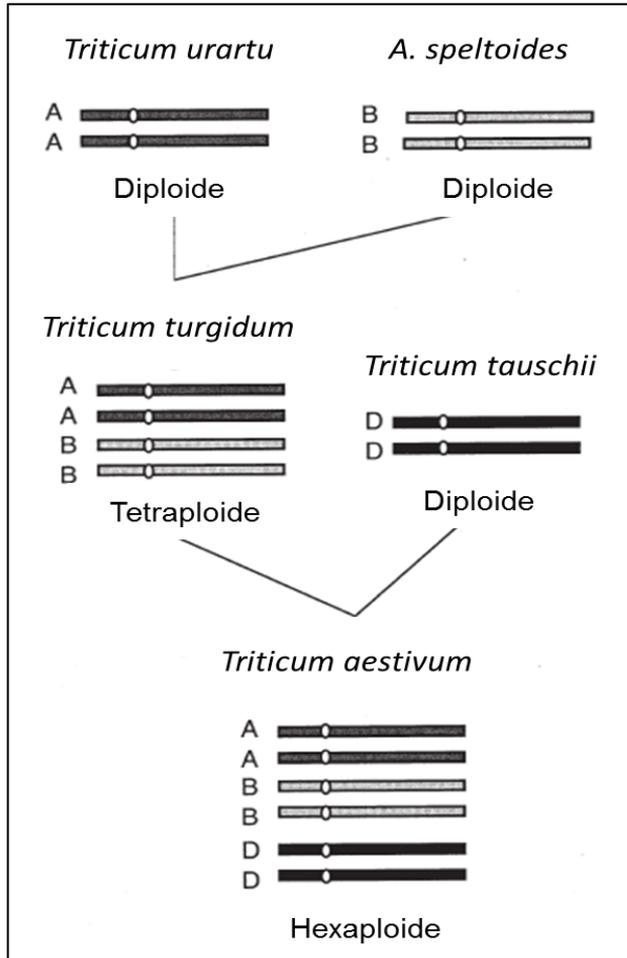


Figura 9. Evolución simplificada de las especies de trigo, desde las variedades ancestrales, hasta las variedades hexaploides. Figura modificada de (Molberg, Øyvind 2005)

Aunque todas las especies de trigo son tóxicas para los celíacos, puesto que todas contienen gluten, numerosos estudios que han cuantificado *in vitro*, la cantidad de gluten y por tanto, de péptidos inmunotóxicos para EC, de diferentes especies, han demostrado que a mayor carga genética, mayor cantidad de epítomos tóxicos, y por tanto concluyen que las variedades de trigo hexaploide, consideradas como el “trigo moderno”, serían más tóxicas para los celíacos que las variedades tetraploides, y ambas a su vez más tóxicas que las variedades diploides, consideradas ancestrales (Molberg et al., 2005; van Herpen et al., 2006; Salentijn et al., 2009). Otro estudio demostró que las secuencias de prolaminas (en concreto de α -gliadinas) de la especie *Triticum tauschii*, donante del genoma D del trigo de panificación (*T. aestivum*), son más ricas en epítomos inmunotóxicos que las de otras especies relacionadas y ésta podría ser una de las razones por las que el trigo hexaploide es más tóxico que el trigo duro, que no posee el genoma D (van Herpen et al., 2006; van Heel et al., 2007; Xie et al., 2010).

Por último, otros estudios también han demostrado que dentro de la misma especie de trigo (hexaploide o tetraploide), el contenido en gluten y por tanto, la toxicidad, puede variar según la estación del año (Wieser, 2000; Fois et al., 2011).

En base a estos estudios *in vitro*, otra de las hipótesis que se han planteado en los últimos años, es que el aumento de los casos de EC en todo el mundo así como uno de los factores ambientales claves en el desarrollo de la EC, podría ser el incremento en el consumo de especies

de trigo consideradas “modernas” y que son hexaploides, en detrimento del consumo de especies ancestrales, las diploides, es decir que otro factor ambiental clave podría ser el tipo de trigo (Van den Broeck, Hetty C et al., 2010). Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio realizado *in vivo*, ha analizado el verdadero impacto del consumo de grandes cantidades de productos con gluten hechos a base de *Triticum aestivum*, y/o *Triticum durum* en población de riesgo genético de EC.

4.3.3 La microbiota

Además de los factores anteriores, en los últimos años, han aumentado los estudios centrados en la microbiota en los que se han descrito alteraciones en la composición de la microbiota intestinal, tanto en biopsias intestinales como en heces de niños y adultos celíacos en comparación con la de controles (Nadal, Donant, Ribes-Koninckx, Calabuig, & Sanz, 2007; Collado, Donat, Ribes-Koninckx, Calabuig, & Sanz, 2009). Además, teniendo en cuenta que la microbiota tiene un papel importante en la modulación de la inmunidad intestinal (Fasano & Shea-Donohue, 2005; Palmer, Bik, DiGiulio, Relman, & Brown, 2007), se ha planteado la posibilidad de que una situación de disbiosis, y por tanto, la microbiota, podría tener un impacto en la patogénesis de la enfermedad (Sanchez et al., 2011).

La mayoría de estudios realizados en este campo, comparan individuos sanos con pacientes celíacos tratados (con dieta exenta de gluten), encontrado cepas más patógenas en aquellos con EC. Uno de los

estudios mostró que en aquellos individuos HLA-DQ2/8 positivos, existía un déficit o ausencia total hasta los 24 meses de edad, de *Bacteroidetes*, en comparación con individuos sin riesgo genético de EC, y se sabe que algunos *Bacteroidetes*, poseen un rol importante en la salud del sistema inmune (Sellitto et al., 2012).

También se han realizado estudios que comparan la microbiota de pacientes en el momento del diagnóstico (sin haber iniciado la dieta sin gluten) con aquellos celíacos que llevan dieta exenta de gluten durante un tiempo, encontrando que tras iniciar la dieta sin gluten, se restablece parcialmente la microbiota, disminuyendo las cepas patógenas y aumentando cepas de bacterias beneficiosas (Nadal et al., 2007; Sanchez, Ribes-Koninckx, Calabuig, & Sanz, 2012; Sapone et al., 2011). Sin embargo, ninguno de los estudios ha encontrado que la microbiota de pacientes celíacos, que siguen estrictamente la dieta sin gluten, lleguen a tener la misma composición que los individuos sanos.

Otro estudio comparó la microbiota de niños con riesgo genético según su grupo de HLA, encontrando que los individuos con un HLA de menor riesgo, tenían mayor número de bacterias beneficiosas, como *Actinobacterias*, y una disminución en el contenido de bacterias patógenas, *Firmicutes*, *Proteobacterias* y *Bacteroidetes*, mientras que en los individuos con mayor riesgo genético (DQ2 homocigotos), se encontró mayor contenido de *Firmicutes*, (*Clostridium*) y *Proteobacterias* y menor contenido de *Actinobacterias*. Por lo tanto, este estudio concluye que el

genotipo de HLA también influye en la composición de la microbiota (Palma, Nova, Pozo Rubio, & Sanz, 2010; Olivares et al., 2015).

Por lo tanto, las evidencias científicas existentes y encontradas hasta la fecha, sugieren la convergencia parcial de los mecanismos de acción de los péptidos del gluten y de potenciales patógenos de la microbiota intestinal, que podría agravar la respuesta inflamatoria y la alteración de la permeabilidad intestinal en la EC (Fasano & Shea-Donohue, 2005). Sin embargo, los resultados del análisis de la composición de la microbiota de los diferentes estudios no son concluyentes, y algunos contradictorios, por lo que, existe una falta de consenso si los cambios en la microbiota son causa o consecuencia del desarrollo de la enfermedad (Cenit, Olivares, Codoñer-Franch, & Sanz, 2015).

4.3.4 Otros factores ambientales

- **Tipo de parto**

Otro de los factores ambientales estudiados, ha sido el tipo de parto. Se sabe, que la cesárea está relacionada con una exposición diferente a determinados tipos de bacterias que podrían ser beneficiosas, que podría afectar a la capacidad de respuesta antimicrobiana de los niños. Partiendo de esta teoría, se especuló con la posibilidad de que aquellos niños nacidos mediante cesárea, tendrían mayor riesgo de desarrollo de EC. Sin embargo, los recientes estudios prospectivos, han demostrado que no existe relación entre el tipo de parto y la incidencia de EC (Stordal,

White, & Eggesbo, 2013; Lionetti et al., 2014; Vriezinga et al., 2014; Emilsson, Magnus, & Størdal, 2015).

- **Infecciones víricas**

Otra de las teorías planteadas, ha sido que las infecciones víricas en los primeros años de vida, especialmente si coinciden con el momento de introducción del gluten, podrían alterar la homeostasis inmune intestinal e iniciar la pérdida de tolerancia oral junto al aumento de la permeabilidad intestinal.

Los estudios prospectivos realizados en cohortes de riesgo, no encontraron asociación con las infecciones víricas y el riesgo de desarrollo de EC (Lionetti et al., 2014; Vriezinga et al., 2014). Sin embargo, un estudio reciente realizado en ratas, ha demostrado que determinados reovirus pueden tener un efecto negativo sobre el sistema inmune y establecer las bases para el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la EC. En este estudio se administró a ratones sanos, dos cepas distintas de reovirus, la T1L, que actúa a nivel de intestino delgado y altera la funcionalidad del sistema inmune, y la cepa T3D, que actúa fuera del tracto gastrointestinal. Los resultados mostraron que, mientras la cepa T3D no tuvo ningún efecto nocivo, la cepa T1L desencadenó una respuesta inflamatoria inmune mucho más agresiva en presencia del gluten, y a su vez, respuesta inducía una sobreexpresión del gen IRF1, implicado en la pérdida de la tolerancia al gluten (Bouziat et al., 2017). Además, los autores también encontraron que los pacientes

con EC presentaban niveles mucho más altos de anticuerpos contra los reovirus, y niveles más altos de expresión de genes IRF1, que los individuos sanos. Por lo tanto, concluyen que la combinación de la infección con un reovirus intestinal y la primera exposición al gluten, en lactantes con riesgo genético, podrían crear las condiciones óptimas para el desarrollo posterior de la EC.

5. Diagnóstico

Tras más de 20 años de aplicación de los criterios diagnósticos de EC, establecidos por la ESPGHAN y vigentes desde 1990, los avances y precisión en las pruebas inmunológicas, así como la comprensión de la implicación y predisposición genética en la EC, dieron lugar a la revisión de estos criterios diagnósticos. En 2012, un grupo de expertos de la ESPGHAN, publicó las nuevas guías para el diagnóstico de EC en edad pediátrica, en la que se valoraron y reconsideraron las cuatro herramientas diagnósticas clásicas: la clínica, los anticuerpos, la genética y la lesión histológica (Husby et al., 2012).

- **Clínica**

Las nuevas guías establecen en qué situaciones hay que investigar el diagnóstico de EC de acuerdo a la sintomatología. Los autores establecen dos grandes grupos de pacientes, aquellos con síntomas clásicos, y pacientes asintomáticos o que pertenecen a algunos de los llamados grupos de riesgo (**Tabla 2**).

Tabla 2. Cuándo investigar la EC de acuerdo a las nuevas guías de diagnóstico la ESPGHAN 2012.

Pacientes con signos y síntomas sugestivos de enfermedad celíaca	Pacientes asintomáticos o pertenecientes a grupos de riesgo
<ul style="list-style-type: none"> • Diarrea crónica o intermitente • Fallo de medro, pérdida de peso, estancamiento ponderal • Pubertad retrasada, amenorrea • Anemia ferropénica • Náuseas o vómitos • Dolor abdominal crónico • Distensión abdominal • Estreñimiento crónico • Fatiga crónica • Aftas bucales recurrentes • Dermatitis herpetiformes • Fracturas óseas con traumatismos mínimos • Osteopenia/osteoporosis • Alteración bioquímica hepática 	<p>En niños y adolescentes que pertenezcan a alguno de los siguientes grupos de riesgo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familiares de primer grado con enfermedad celíaca • Diabetes mellitus tipo 1 • Síndrome de Down • Enfermedad tiroidea autoinmune • Síndrome de Turner • Síndrome de Williams • Déficit selectivo de inmunoglobulina tipo A • Hepatitis autoinmune

- **Anticuerpos**

Anticuerpos antiendomiso (AAE): la especificidad de estos anticuerpos, en manos de laboratorios expertos, está entre el 98 y el 100%, por lo que

deben considerarse como el estándar de referencia de anticuerpos específicos de EC.

Anticuerpos antitransglutaminasa tipo 2 (anti-TG2): niveles altos de estos anticuerpos (>10 respecto al valor de referencia), pueden considerarse como valores altamente específicos de EC. Sin embargo, cuando los niveles son positivos pero bajos, deben confirmarse con la determinación de los AAE, y/o biopsia, ya que en determinadas enfermedades se han detectado títulos bajos de anti-TG2 (enfermedades autoinmunes, tumores, psoriasis).

Anticuerpos antigliadina deaminada (anti-DGP): los anti-DGP pueden usarse inicialmente o conjuntamente cuando los otros anticuerpos son negativos, cuando el paciente es menor de 2 años de edad o cuando existe deficiencia primaria o secundaria de inmunoglobulina tipo A (IgA).

- **Genética**

Está ampliamente demostrado que un HLA-DQ2/DQ8 positivo es una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de EC. Aunque más del 95% de los pacientes con EC son positivos para este HLA, entre el 30-40% de la población caucásica presenta este genotipo pero solo el 1% desarrolla la enfermedad. Sin embargo, se sabe que individuos HLA-DQ2/DQ8 negativos, tienen muy poca probabilidad de desarrollar la enfermedad.

Por lo tanto, en las nuevas guías, se establece que el estudio genético, por su alto valor predictivo negativo, sirve principalmente para descartar la EC con un 99% de certeza.

- **Biopsia intestinal**

En cuanto a las lesiones histológicas, se consideran determinantes en el diagnóstico de EC, solo aquellas lesiones Marsh-2 (hiperplásica) y Marsh-3 (que va desde la atrofia parcial, subtotal o la total).

En cambio, las lesiones de bajo grado (Marsh-1, infiltrativa), no son específicas de EC, ya que solo el 10% de los individuos con Marsh-1 tiene EC. Por eso, los expertos establecen que en casos de lesiones de bajo grado, es necesaria la realización de métodos complementarios para el estudio de las biopsias, como citometría de flujo (recuento de linfocitos intraepiteliales) y determinación de depósitos de TtG en mucosa.

Además, por primera vez en estas guías, se valora la posibilidad de omitir la biopsia intestinal, pero solo en sujetos claramente sintomáticos, con valores de anticuerpos anti-TG2 > 10 respecto al valor de referencia, AAE positivos y HLA-DQ2 y/o DQ8 positivos. En todos los demás casos, la primera biopsia es obligatoria. La posibilidad de evitar la biopsia en determinados casos, se ha considerado uno de los hitos más relevantes de esta guía.

También se establece que, a diferencia de los criterios anteriores a 2012, no es necesario repetir la biopsia intestinal si el diagnóstico es inequívoco y hay buena respuesta clínica y serológica a la retirada del gluten.

Finalmente, como resumen práctico, el documento incluye unos algoritmos diagnósticos a seguir, que se diferencian entre pacientes con sintomatología y pacientes asintomáticos. Las **Figuras 10 y 11**, muestran estos algoritmos simplificados.

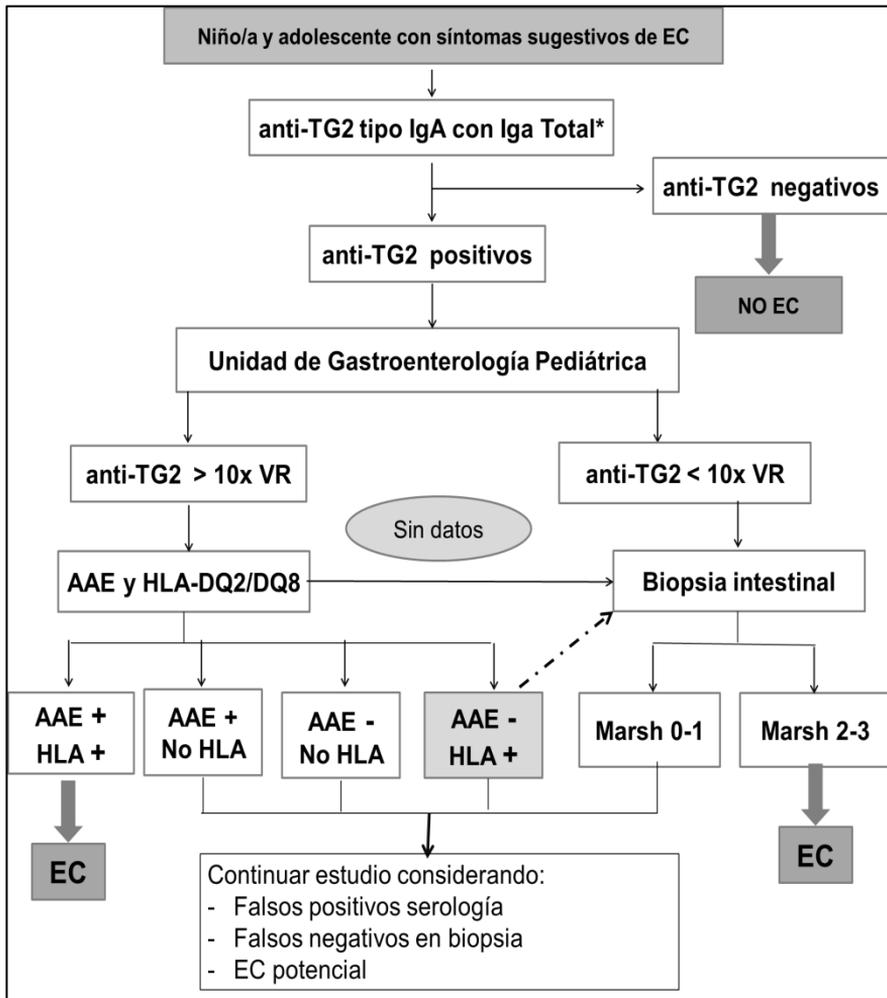


Figura 10. Algoritmo diagnóstico para pacientes pediátricos con sospecha clínica de EC (sintomáticos). *En caso de déficit de IgA, se realizará la determinación de anticuerpos de clase IgG. Anti-TG2: anticuerpos antitransglutaminasa tipo 2; VR: valor de referencia; AAE: anticuerpos antiendomiso; EC: Enfermedad celiaca. Modificada de (Husby et al., 2012)

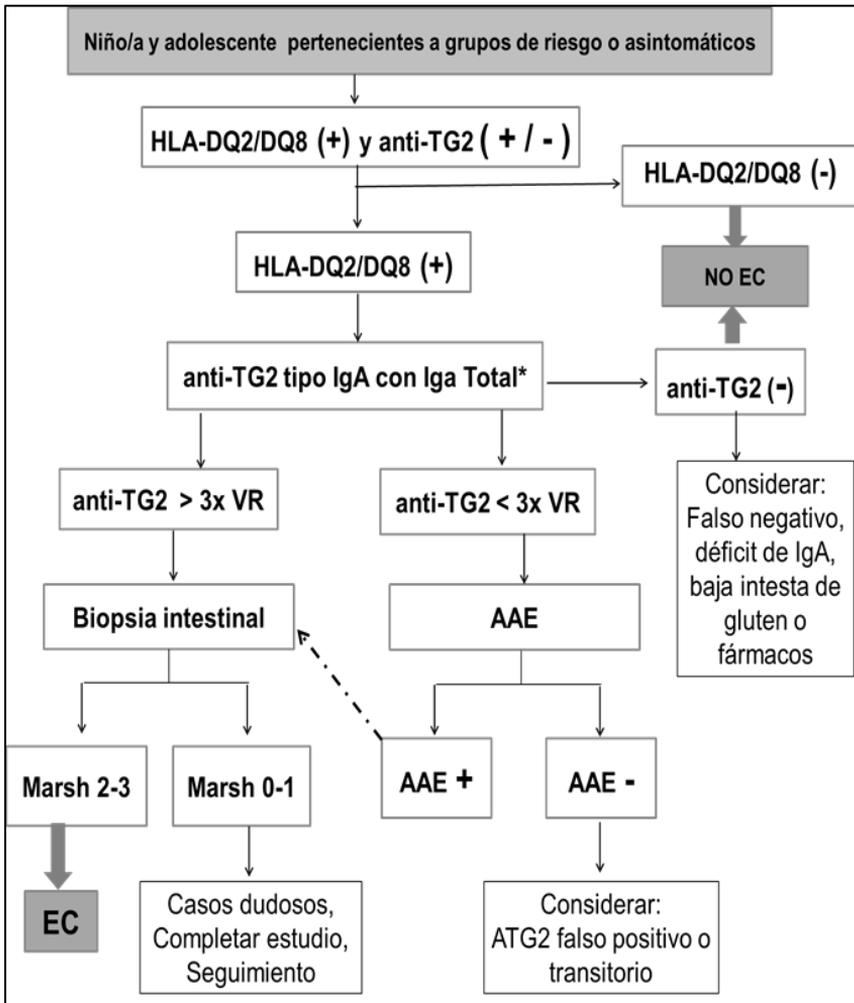


Figura 11. Algoritmo diagnóstico para pacientes pediátricos asintomáticos, pertenecientes a grupos de riesgo. *En caso de déficit de IgA, se realizará la determinación de anticuerpos de clase IgG. Anti-TG2: anticuerpos antitransglutaminasa tipo 2; VR: valor de referencia; AAE: anticuerpos antiendomiso; EC: Enfermedad celiaca. Modificada de (Husby et al., 2012)

6. Tratamiento

Actualmente, tras el correcto diagnóstico de la EC, el único tratamiento eficaz es el seguimiento de por vida de una dieta estricta exenta de gluten, tanto en aquellos pacientes sintomáticos como asintomáticos, ya que las consecuencias son las mismas. Tras el inicio de la dieta, se consigue la mejoría de los síntomas a partir de las dos semanas, en aquellos que los tengan, la disminución de los niveles de anticuerpos y normalización serológica entre los 6 y los 12 meses, y por último la recuperación de las vellosidades intestinales alrededor de los 2 años tras el inicio de la dieta (Bravo, 2011).

Es importante una adecuada adherencia a la dieta ya que está demostrado que la ingestión de pequeñas cantidades de gluten, aunque no provoquen síntomas, producen daño a nivel de las vellosidades intestinales que pueden dar lugar a la aparición de malignomas, además de otras complicaciones como osteoporosis (Gibert et al., 2006; Catassi et al., 2007; Gibert et al., 2013).

La DSG supone la eliminación de la dieta de todos los productos que lleven como ingrediente trigo, cebada, centeno, espelta, kamut y triticale (cereal obtenido del cruce de trigo y centeno), así como todos los derivados de estos cereales: harinas, almidones, panes, pastas, etc (Kupper, 2005). El caso de la avena y su toxicidad en la EC, sigue en entredicho, ya que algunos estudios no encuentran lesión histológica tras 5 años de provocación con avena en adultos celíacos, mientras que otros autores si han encontrado lesión histológica mediada por células T

específicas para la avenina (Kilmartin, Lynch, Abuzakouk, Wieser, & Feighery, 2003; Lundin et al., 2003; Arentz-Hansen et al, 2004b). En población pediátrica, los estudios más relevantes mostraron que tras un año consumiendo avena, no se observaron alteraciones en la mucosa intestinal ni se detectaron niveles elevados de anticuerpos (Holm et al., 2006). Sin embargo, actualmente no existe unanimidad entre los expertos en la consideración de la avena como un cereal seguro para los individuos con EC y algunos sugieren que al tener la avena un contenido en prolaminas inferior al de los otros tres cereales, sus efectos podrían manifestarse a más largo plazo o incluso solo en aquellos individuos con mayor riesgo y sensibilidad a estas prolaminas. Además de estos estudios, hay que considerar que otro de los problemas de la avena y productos elaborados a base de este cereal, y es que existe frecuentemente una contaminación cruzada con prolaminas de otros cereales. Por lo tanto, la recomendación más generalizada es la de evitar también el consumo de avena.

La DSG debe basarse principalmente en aquellos alimentos que por naturaleza no contienen gluten, como son carnes, pescados, huevos, lácteos y derivados, frutas, frutos secos, verduras, hortalizas, legumbres y cereales o pseudocereales (preferiblemente integrales), sin gluten (maíz, arroz, mijo, sorgo, quinoa y amaranto). Los productos manufacturados y comercializados, etiquetados como “sin gluten”, son seguros, pero su consumo, al igual que en el caso de una dieta normal, debe ser ocasional. Sin embargo, aunque esto puede parecer sencillo, lo cierto es

que en la práctica, los celíacos se enfrentan a numerosos problemas, como la ambigüedad de la legislación, la posible falta de veracidad de los etiquetados de productos manufacturados, la posible contaminación cruzada industrial, dificultades para comer fuera de casa en comedores escolares o restaurantes, el elevado precio de los productos especiales “sin gluten”, el gluten oculto en algunos medicamentos, o productos envasados que por naturaleza no deberían llevar gluten, como embutidos, salsas, frutos secos fritos, gominolas, algunos derivados lácteos aromatizados, conservas de carne o pescado, etc (Bustamante et al., 2017).

Por último destacar que el principal efecto secundario asociado a la DSG, es la aparición de estreñimiento por la eliminación de productos basados en cereales ricos en fibra (Öhlund, Olsson, Hernell, & Öhlund, 2010; Martin, Geisel, Maresch, Krieger, & Stein, 2013). Sin embargo, está demostrado que con una dieta variada y equilibrada, aumentando el consumo de frutas, verduras, legumbres y cereales sin gluten integrales, se puede corregir el estreñimiento. Por otro lado, algunos sujetos presentan déficit de vitaminas y oligoelementos tras un largo periodo de DSG, que muchos autores han atribuido al hecho de que muchos de los productos a base de cereales con gluten están enriquecidos con vitaminas y minerales (hierro, calcio, tiamina, ácido fólico, niacina), y por lo tanto, su eliminación de la dieta podría dar lugar a desequilibrios nutricionales (Hallert et al., 2002; Theethira, Dennis, & Leffler, 2014; Topal et al., 2015; Vici, Belli, Biondi, & Polzonetti, 2016). Sin embargo,

recientemente se ha demostrado que los déficit nutricionales encontrados en pacientes con EC, son consecuencia de una mala planificación individual o falta de consejo dietético profesional, y no por la exclusión del gluten de la dieta (Kautto et al., 2014; Theethira & Dennis, 2015).

Aunque existen otros tratamientos en fase de experimentación, el único tratamiento eficaz y seguro, disponible hasta la fecha, es el seguimiento estricto de una DSG.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Se sabe que el genotipo HLA-DQ2/DQ8 está ampliamente distribuido en población general, sin embargo solo 1/3 de los individuos genéticamente susceptibles acaba desarrollando una EC, lo que supone una incidencia aproximadamente del 1% de la población general. En el caso de familiares de primer y segundo grado de personas diagnosticadas de EC, la prevalencia estimada es mayor, entorno al 7%, variando en España entre el 2-7%, aunque estos estudios están realizados solo en población adulta, lo que significa que ninguno estima la prevalencia en población pediátrica de riesgo (Esteve et al., 2006; Vaquero et al., 2014; Singh et al., 2015;). Por lo tanto, considerando estas diferencias en la prevalencia de EC, numerosos estudios clásicos observacionales han sugerido la necesidad de determinados factores ambientales cuyo papel sería fundamental en la etiopatogenia de la enfermedad. Por un lado, según estos estudios retrospectivos, el consumo de grandes cantidades de gluten durante los primeros meses de vida, en población de riesgo genético de EC, podría ser uno de los factores ambientales claves. Sin embargo, ninguno de los estudios ha evaluado ni cuantificado, con herramientas analíticas fiables y validadas, y de manera prospectiva y regular este consumo. De modo que la evidencia de los datos de los que disponemos hasta ahora, no permiten afirmar esta hipótesis. Y por otro lado, estudios *in vitro*, han

demostrado que las variedades de trigo hexaploides, contienen mayor número de epítomos tóxicos para EC, sugiriendo que el continuo crecimiento del consumo de estas variedades por parte de la población, podría ser otro de los factores ambientales implicados en el aumento del número de casos de EC. Sin embargo, hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio *in vivo*, en población de riesgo, evaluando el verdadero impacto del tipo de trigo consumido y el riesgo de desarrollo de la enfermedad, que permitan afirmar esta hipótesis.

Por todo ello, es necesario analizar y cuantificar de forma prospectiva, utilizando herramientas analíticas fiables y validadas, el consumo de gluten así como el tipo de trigo consumido, para establecer el verdadero impacto de estos dos factores ambientales en el desarrollo de la EC.

2. Objetivos

- **Objetivo primario**

El objetivo general de esta tesis, es evaluar el impacto de la cantidad de gluten consumida y del patrón de consumo así como del tipo de trigo consumido durante los primeros años de vida, en el desarrollo de la EC, en una población pediátrica Europea de riesgo genético, seguida desde el nacimiento hasta, al menos, 6 años.

Para conseguir dicho objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo y validación de cuestionarios de frecuencia de consumo (CFC), para disponer de herramientas fiables para el cálculo del consumo de gluten.
- Identificar las principales fuentes de gluten de la dieta en la población estudiada.
- Cuantificar la cantidad de gluten contenida en los diferentes alimentos consumidos por los sujetos.
- Evaluar el tipo de trigo utilizado en la elaboración de los productos consumidos por los sujetos.
- Comparar la cantidad de gluten consumida en los distintos países.
- Comparar el tipo de trigo consumido en los distintos países.

- Analizar cuál de los factores estudiados, tiene mayor impacto en el desarrollo de la enfermedad.

- **Objetivo secundario**

Además del objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

- Estudiar las formas de debut de la enfermedad en población pediátrica de riesgo, en la cohorte Española.
- Establecer la prevalencia de EC en esta población pediátrica, familiares de primero grado de EC, seguida prospectivamente desde el nacimiento.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos objeto del estudio

Los sujetos de este estudio, pertenecen a la cohorte del Proyecto Europeo PreventCD (www.preventcd.com). El estudio PreventCD, es un estudio aleatorizado de doble ciego, cuyo principal objetivo era analizar la incidencia de EC a los 3 años, tras la introducción precoz del gluten, entre los 4 y 6 meses, en una cohorte Europea, compuesta por sujetos de 8 países, con riesgo genético, reclutados desde el nacimiento, entre 2007 y 2010, y seguidos prospectivamente, al menos hasta los 3 años.

A partir de los 3 años, y al menos hasta los 6, se continuó con el seguimiento de la cohorte, cuyos principales resultados se muestran en este trabajo.

- **Criterios de inclusión**

Para la inclusión en el estudio, era necesario cumplir los dos siguientes criterios:

- Recién nacidos, reclutados entre 0-3 meses de edad, con riesgo de EC, es decir: (1) HLA-DQ2/D8 positivos o con el alelo DQB1*02; (2) con al menos un familiar de primer grado con EC diagnosticado con biopsia.
- Recién nacidos cuyos padres o tutores legales, firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

- **Criterios de exclusión**

Cumplir cualquiera de los siguientes criterios, fue motivo de exclusión.

- Recién nacidos diagnosticados con síndromes asociados con mayor riesgo de EC, como Síndrome de Turner o con trisomía 21.
- Niños nacidos antes de las 36 semanas, excepto aquellos bebés sanos nacidos entre las 34-36 semanas que pesaron más de 2 kg. No se aplicó restricción de peso en gemelos sanos nacidos entre las 34 y 36 semanas.
- Niños cuyos padres o tutores legales, retiraron el consentimiento informado.

2. Diseño del estudio

Como se ha expuesto en el apartado anterior, los sujetos pertenecían a la cohorte del PreventCD y por lo tanto todos ellos siguieron el mismo protocolo de estudio y seguimiento (Hogen Esch et al., 2010).

- **Intervención**

El objetivo primario del PreventCD, era analizar si la introducción del gluten entre los 4 y los 6 meses de edad podía prevenir el desarrollo de EC en población de riesgo. De modo que se aleatorizaron los sujetos en dos grupos, un grupo (grupo A), recibió diariamente entre los 4 y 6 meses 200 mg de gluten vital en polvo (equivalente a 100 mg de gluten inmunológicamente reactivo) y otro grupo (grupo B)

recibió placebo (2 g de lactosa en polvo). La aleatorización se realizó de manera informatizada en el departamento de estadística del Hospital Universitario de Leiden (Países Bajos), de modo que ni los investigadores ni los participantes, sabían a qué grupo pertenecía cada sujeto.

El gluten empleado, se adquirió de la empresa Cargill, y todos los sobres que se distribuyeron pertenecían al mismo lote. Cuando el gluten se extrae del trigo, queda un polvo de color marrón, que tiene un sabor neutro, que es estable a temperatura ambiente y que conserva todas las propiedades así como los péptidos inmunogénicos. Para asegurar que el lote adquirido contenía la cantidad de gluten así como los péptidos inmunogénicos, se realizaron varias pruebas: dos test ELISA, el ELISA R5 y un nuevo sistema ELISA, el Gluten-tecR, y también un análisis Western blot con anticuerpos monoclonales específicos de gluten. De modo que se considera que el gluten empleado durante el periodo de intervención, es representativo del gluten que se consume habitualmente. Todos los sujetos recibieron al inicio del estudio, los sobres necesarios para realizar la intervención.

Por otro lado, los sobres de placebo contenían 2 g de lactosa también en polvo y se distribuyeron de la misma forma que los anteriores.

Después de las 8 semanas de intervención, ambos grupos recibieron la misma cantidad de gluten mediante unas recomendaciones simples y estandarizadas, que se les dio a los padres, utilizando productos regulares disponibles en todos los países: de 6 a 7 meses, recibieron 250 mg de gluten (equivalente un cacito y medio de cereales en polvo), de 7 a 8 meses, recibieron 500 mg de gluten (equivalente a un cacito de cereales en polvo más una galleta tipo maría), de 8 a 9 meses 1000 mg de gluten (dos cacitos de cereales más dos galletas tipo maría) y de 9 a 10 meses recibieron 1500 mg de gluten (equivalente a cuatro cacitos de cereales más dos galletas tipo maría). A partir de los 10 meses, los padres no recibieron ningún tipo de recomendación nutricional y se permitió un consumo libre de gluten de acuerdo a los hábitos alimentarios de cada país participante. Este consumo se registró y cuantificó hasta los 36 meses.

- **Seguimiento**

El seguimiento de los pacientes consistió en la evaluación periódica, desde el nacimiento hasta los 3 años, cada 2-3 meses, realizando exploración física (peso, talla, perímetros), determinación de los niveles de anticuerpos anti-TG2, IgA total y evaluación de síntomas característicos de EC. La periodicidad de los controles aparece en la **Tabla 3**. Las determinaciones de los niveles de anticuerpos de, todas las muestras de suero tomadas de cada niño, se analizaron de

manera centralizada por una de las empresas participantes en el Proyecto PreventCD (Thermo Fisher Scientific, Freiburg, Germany).

Para el marcador AGA, se consideraron positivos, valores por encima de 17 U/mL y para Anti-TG2, valores por encima de 6 U/mL.

A partir de los 3 años, se continuó con el estudio de aquellos sujetos cuyos padres mantuvieron el consentimiento, realizándose un seguimiento periódico anual con las mismas determinaciones citadas en el párrafo anterior, estando la mayoría de ellos en el momento actual todavía en seguimiento en las Unidades clínicas correspondientes.

Tabla 3. Cronograma de intervenciones, determinaciones y recogida de muestras realizadas durante el estudio.

Edad en meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	18	20	22	24	28	30	34	36	
Aleatorización			X																				
Intervención				X	X	X																	
Incremento pautado gluten							X	X	X	X													
Consumo libre de gluten											X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Registro dietético				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Muestras de leche materna	X	X	X	X	X	X	X	X	X														
Medidas antropométricas	X	X	X	X	X	X			X			X			X			X					X
Evaluación clínica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Muestras de sangre	X*			X [#]		X [#]			X [#]			X [#]			X [#]			X [#]					X [#]

*Determinación del genotipo HLA; # Marcadores serológicos específicos de EC. Tabla adaptada de (Hogen et al., 2010).

- **Grupo de riesgo HLA**

La estratificación de los grupos de riesgo genético, dependiendo de los haplotipos de HLA, se hizo de acuerdo a una clasificación de riesgo previamente establecida (Bourgey et al., 2007).

Los grupos establecidos fueron:

- Grupo HLA 1 (de mayor riesgo): DQ2.5/DQ2.5; DQ2.5/DQ2.2.
- Grupo HLA 2: DQ2.2/DQ7.
- Grupo HLA 3: DQ2.5/DQ7; DQ2.5/DQ8; DQ2.5/otro.
- Grupo HLA 4: DQ2.2/DQ2.2; DQ2.2/DQ8; DQ8/DQ8.
- Grupo HLA 5 (de menor riesgo): DQ2.2/otro; DQ8/DQ7; DQ8/otro.

El haplotipo “otro”, se refiere a cualquier haplotipo que no sea ninguno de los descritos en alguno de los grupos de HLA.

- **Diagnóstico de EC**

El diagnóstico de todos los casos de EC, se realizó de acuerdo a los criterios de la ESPGHAN 2012 (Husby et al., 2012).

Por un lado, se les realizó biopsia a los sujetos con anticuerpos específicos de EC elevados (más de 10 veces el valor de referencia) junto con síntomas gastrointestinales característicos de EC. Pero también, a los sujetos con síntomas extraintestinales (diarrea crónica,

malabsorción, fallo de medro, etc) y niveles de anticuerpos específicos de EC elevados.

Y por otro lado, en el caso de los sujetos completamente asintomáticos, se les realizó biopsia aquellos que presentaron: 1) niveles de anticuerpos anti-TG2 elevados en 2 ocasiones, en un intervalo de 3 meses; 2) anticuerpos antigliadina de clase IgA (AGA) elevados (>50 U/ml) en 3 ocasiones en un intervalo de 3 meses; 3) un aumento significativo y claro de niveles de AGA en 2 análisis realizados en un intervalo de 3 meses (niveles > 17 y < 50 U/ml para la primera muestra positiva y un aumento de al menos 20 U/ml para la segunda muestra positiva).

Las biopsias se realizaron mediante endoscopia digestiva y se obtuvieron 4 muestras de la segunda parte del duodeno y 2 del bulbo duodenal. La histología de cada biopsia se evaluó localmente por los anatomopatólogos de cada hospital y adicionalmente, al igual que con las muestras de suero, las muestras de biopsias fueron evaluadas de forma centralizada en Departamento de Anatomía Patológica, del Instituto de Patología de Brescia, Italia, por el Profesor Villanacci.

La histología de las biopsias se clasificó de acuerdo a la clasificación de Marsh-Oberhuber (Oberhuber, Granditsch, & Vogelsang, 1999).

Finalmente, todos los casos fueron revisados, discutidos y confirmados por un comité de diagnóstico de expertos que formaban parte del estudio principal PreventCD.

- **Aspectos éticos**

El estudio PreventCD fue aprobado por los Comités Éticos de todos los hospitales participantes, cumpliendo con las normas de Buenas Prácticas Clínicas. Además, durante todo el periodo del estudio se contó con el apoyo y orientación de un consejero externo experto en aspectos éticos, miembro del Comité de Helsinki, el cual formó parte de la supervisión y gestión de todos los documentos e informes elaborados durante el estudio, asegurando el cumplimiento de los aspectos éticos.

Todos los padres o tutores legales de los sujetos incluidos, fueron informados verbalmente y por escrito del estudio y firmaron el consentimiento informado.

3. Materiales

- **Base de datos ProMISe**

Todos los datos obtenidos de cada sujeto durante el estudio, se registraron en una base de datos común, la base de datos ProMISe. Ésta, es una aplicación de gestión de datos basada a su vez en la web que utiliza una base de datos central de SQL (Structured Query

Language) gestionada de manera centralizada desde el Departamento de Estadística Médica y Bioinformática, del Hospital Universitario de Leiden.

Cada investigador, contaba con un usuario y contraseña personalizados que le daba acceso solo a los datos de los sujetos de su país.

- **Registros dietéticos**

Para el desarrollo del CFC, se utilizó un registro dietético de 24 horas. Posteriormente, para la validación de los CFC, se utilizaron dos tipos de registros alimentarios, por un lado un registro alimentario de dos días, y por otro un registro alimentario de 7 días. En los tres registros se recogía la misma información, solo se diferenciaban en la cantidad de días que debían completarse (1, 2 o 7). En todos los casos, los padres recibieron instrucciones precisas de cómo rellenarlos, entregadas y explicadas siempre por la misma persona, una dietista-nutricionista especializada.

En el **Anexo I**, se muestra un ejemplo de la plantilla utilizada, correspondiente a 1 día de registro dietético.

4. Métodos

4.1 Desarrollo y validación de los cuestionarios de frecuencia de consumo.

Para cumplir con el principal objetivo de esta tesis se planteó el desarrollo de herramientas fiables que permitieran calcular con precisión el consumo de gluten . En el caso de España, el cálculo de gluten consumido se hizo con cuestionarios de frecuencia de consumo, diseñados, desarrollados y validados para este fin. En el resto de países se utilizaron cuestionarios de frecuencia de consumo, también diseñados y desarrollados para el mismo fin, o bien registros dietéticos de 7 días, método considerado como el patrón de oro para la evaluación de la ingesta dietética.

- **Estudio piloto: selección de los ítems a incluir en los CFC.**

Para el desarrollo de un CFC, se recomienda primero realizar un estudio piloto para identificar adecuadamente los ítems que se van a incluir, así como el tamaño de las porciones (Cade, Thompson, Burley, & Warm, 2002). En nuestro caso, realizamos un estudio piloto previo para identificar los alimentos con gluten consumidos entre los 7 y los 36 meses de edad. En este estudio, familias con bebés de edades comprendidas entre ese rango de meses, completaron de forma prospectiva un registro dietético de 24 horas (**Anexo I**). En este

registro anotaron los alimentos consumidos, el tamaño de las porciones y las marcas comerciales.

Para este estudio piloto, los niños se reclutaron en guarderías, en escuelas de primaria así como en centros de atención primaria de la Comunidad Valencia. Los criterios de exclusión fueron: (1) cualquier disfunción oral-motora, (2) alergia alimentaria diagnosticada, (3) cualquier enfermedad gastrointestinal o cualquier trastorno gastrointestinal menor (diarrea, estreñimiento, reflujo gastroesofágico) (4) desnutrición y (5) niños con restricciones dietéticas o siguiendo dietas específicas.

De los registros completados, se extrajeron los productos con gluten consumidos en estas edades y el tamaño medio de porción, que se incluyeron posteriormente en los CFC. No fueron incluidos aquellos alimentos que declaraban solo trazas de gluten, ya que no se podía calcular la cantidad de gluten exacta contenida.

Finalmente, en el estudio piloto, se observó que a partir de los 12 meses, se introducían nuevos alimentos con gluten, y se dejaban de consumir también otros alimentos, por lo que se decidió desarrollar dos CFC, uno de 7 a 12 meses, y otro de 13 a 36 meses (**Anexos II y III**).

- **Diseño y desarrollo de los CFC.**

Una vez identificados los alimentos con gluten consumidos, se definieron los alimentos, las porciones y las frecuencias de consumo que se incluirían en cada uno de los CFC.

En el CFC de 7 a 12 meses, se incluyeron 13 grupos de alimentos y preguntas complementarias sobre la edad de introducción de cada alimento, lactancia materna, tipo y marcas de fórmulas y cereales infantiles. En el CFC de 13 a 36 meses, se consideraron 20 grupos de alimentos y se incluyeron las mismas preguntas complementarias excepto la edad de introducción de cada alimento.

Productos:

Los productos se agruparon por grupos de alimentos de acuerdo a su composición y formulación. Los grupos de alimentos incluidos fueron: pan, galletas, bollería, bizcocho, picos de pan/rosquilletas, cereales, pasta, rebozados, productos lácteos con galletas y potitos.

En el caso del pan, se diferenció entre pan y pan de molde, para facilitar la recogida de información a los padres y también porque el tamaño de las porciones consumidas era diferente según si era pan de molde o pan de barra. De esta manera evitábamos subestimar o sobrestimar el gluten consumido procedente del pan.

Para las galletas, se diferenciaron por un lado por marcas, ya que había una marca que contenía significativamente mayor cantidad de gluten, y por otro por tipo, ya que el tamaño de la porción de las galletas de chocolate era mayor.

Los cereales infantiles también se dividieron en dos subgrupos, por un lado una marca concreta de cereales, que contenía significativamente más gluten y en el otro subgrupo, se agruparon el resto de marcas consumidas. Los cereales de desayuno también, se diferenciaron por la cantidad de gluten en cereales normales y cereales con chocolate.

Finalmente, para la pasta también se consideraron dos subgrupos, por un lado la pasta utilizada para sopas (tipo estrellas, letras, fideos), ya que las raciones usadas en estos casos eran menores, y por otro lado la pasta tipo macarrones, espirales, lazos y espaguetis, ya que las raciones usadas en estos casos eran mayores.

Porciones:

El tamaño de porción de cada grupo de alimento, se estableció de acuerdo a la información obtenida en el estudio piloto: **una rebanada** para el pan (cualquier tipo), pero se diferenció la cantidad según el tipo de pan, una rebanada de pan normal se consideró 40 g y una rebanada de pan de molde se consideró 30 g; **una unidad y/o porción** para galletas, picos de pan/rosquilletas, potitos, productos

rebozados, productos lácteos con galletas y bollería; **cacitos** para los cereales infantiles; **cucharadas** para los cereales de desayuno y **tamaño de plato** para la pasta.

Frecuencias:

En ambos CFCs, se establecieron las siguientes frecuencias de consumo: nunca, menos de una vez por semana, de 1 a 3 veces por semana, de 4 a 6 veces por semana, una vez al día, dos veces al día y tres o más veces al día. Son frecuencias estándar establecidas y utilizadas en CFC generales y similares (Magkos, Manios, Babaroutsi, & Sidossis, 2006; Hopman et al., 2007; Marriott et al., 2008; Marriott et al., 2009; Hopman, Pruijn, Tabben, le Cessie, & Mearin, 2012). Además de las frecuencias, se pedía a los padres que especificaran también la cantidad de producto consumido, por ejemplo: 3 galletas, 2 potitos, 3 nuggets de pollo, etc. Finalmente, en el caso de “tres o más veces al día”, también se pidió a los padres que especificaran tanto la cantidad de producto consumido como el número exacto de veces al día que se consumía

- **Conversión de la frecuencia a ingesta media diaria de gluten.**

La frecuencia semanal de gluten recogida en cada cuestionario, se convirtió a ingesta media diaria de gluten (IMDG). En primer lugar se determinó la cantidad de gluten contenida en cada porción individual de cada producto, que se explicará a continuación. Esta cantidad se

atribuyó a la frecuencia “una vez al día”, en caso de que se consumiese solo una unidad del producto, y a partir de estas cantidades se convirtieron el resto de frecuencias, de la siguiente manera:

- “*Menos de una vez a la semana*”: en este caso, la cantidad de gluten de una porción individual se dividió entre 14 asumiendo que esta frecuencia sería aproximadamente una vez cada 2 semanas (14 días). En el caso de que los padres especificaran que el niño comía, por ejemplo, 3 galletas, pero "menos de una vez a la semana", la cantidad de gluten total de 3 porciones individuales se dividió por 14, y así con el resto de productos.
- “*De 1 a 3 veces por semana*”: en este caso, la cantidad de una porción individual se dividió entre 7 días y se multiplicó por 2 (2 se consideró el promedio de "1 a 3 veces por semana"). Igual que para el caso anterior, si los padres especificaban que el niño comía, por ejemplo, 3 unidades de un producto pero de 1 a 3 veces por semana, la cantidad de gluten total de las 3 porciones individuales se dividió entre 7 y se multiplico por 2.
- “*De 4 a 6 veces por semana*”: para esta frecuencia, la cantidad de gluten de una porción individual se dividió entre 7 y se multiplicó por 5 (considerándose 5 como el promedio de “4 a 6 veces por semana”). Cuando el niño consumía más de una porción de

producto pero de 4 a 6 veces por semana, se procedió de la misma forma especificada en las frecuencias anteriores.

- “*Una vez al día*”: si en esta opción los padres solo marcaban la X, se consideró la cantidad de gluten contenida en cada una de las porciones individuales de cada producto. En el caso de lo que los padres especificaran el número de porciones consumidas, aunque fuese una vez al día, se multiplicó la cantidad de gluten del producto por el número total de porciones consumidas.
- “*Dos veces al día*”: si en esta opción, los padres solo marcaban la X, para el cálculo multiplicó la cantidad de gluten contenida en un porción individual por 2. En aquellos casos en los que los padres especificaban el número de porciones consumidas, por ejemplo “3 galletas” dos veces al día, se multiplicó, la cantidad de gluten de una galleta por 3 y esta cantidad de gluten obtenida, por 2. Y así con todos los productos.
- “*Tres o más veces al día*”: en esta opción, se les pedía a los padres que si era más de 3 veces, especificasen cuantas veces. Por lo tanto, si en esta opción, los padres solo marcaban la X, para el cálculo, se multiplicó la cantidad de gluten contenida en un porción individual por 3. En aquellos casos en los que los padres especificaban el número de porciones consumidas y el número de veces, se multiplicó la cantidad de gluten de una porción individual por el número de porciones consumidas y por

las veces consumidas. Por ejemplo, “3 galletas, 4 veces al día”, se multiplicó la cantidad de una galleta por 3 y la cantidad obtenida por 4.

- **Cálculo de la cantidad de gluten de cada producto.**

El cálculo de la cantidad de gluten contenida en cada alimento, se hizo de acuerdo al método generalmente aceptado de Overbeek et al. (van Overbeek et al., 1997), mediante el cual se considera que el gluten representa el 80% total de las proteínas vegetales de aquellos alimentos que contienen gluten. Por lo tanto, para calcular la cantidad de gluten de cada alimento, se multiplicó por 0,8 los gramos de proteínas vegetales de cada producto.

En primer lugar, se identificaron a partir del estudio piloto los productos consumidos que contenían gluten así como las diferentes marcas referidas. En segundo lugar, se calculó la cantidad de proteínas vegetales que contenía cada uno de estos productos. Para ello se utilizaron las etiquetas de los alimentos, tablas específicas de composición de alimentos, las páginas webs oficiales de las empresas, o a través de información directamente proporcionada por las empresas tras contacto telefónico. Finalmente, con toda la información recabada, se creó una base de datos con el contenido exacto de gluten de todos los productos y marcas identificadas, por 100 gramos y por ración consumida.

Una vez obtenida la cantidad de gluten de todos los productos, se hizo una media por grupo de alimento para facilitar el cálculo posterior del consumo de gluten. Las medias se hicieron para los siguientes grupos, descritos anteriormente: pan, pan de molde, galletas, galletas de chocolate, bollería, bizcocho, picos de pan/rosquilletas, cereales infantiles, cereales de desayuno, pasta para sopa, pasta, rebozados, productos lácteos con galletas y potitos de fruta y potitos salados. En el caso de las galletas, hubo una marca que se consideró por separado para el cálculo por su diferencia significativa en el contenido de gluten en comparación con el resto de marcas de galletas similares.

- **Validación de los cuestionarios de frecuencia de consumo.**

La validación de un cuestionario de frecuencia de consumo, debe hacerse con el fin de evaluar si el cuestionario desarrollado está midiendo correctamente lo que queremos. Para ello, debe comprobarse que las mediciones tomadas con el CFC coinciden con las obtenidas con el “patrón de oro” y/o con otros métodos de medición generalmente aceptados o previamente validados. En el caso de la evaluación de la ingesta dietética, el patrón de oro se considera un registro dietético de 7 días (RD-7). Pero debido a la complejidad y tiempo que se requiere para completarlo, también se utilizan otro tipo de registros, como el registro dietético de 2 días (RD-2), para la validación de CFC (Cade et al., 2002).

La validación de nuestros CFC la hicimos frente a los dos métodos, primero frente a un RD-2 y posteriormente frente al patrón de oro, un RD-7.

Cálculo del tamaño muestral: CFC versus RD-2.

El tamaño de la muestra necesario para la validación, dependerá del método estadístico que se vaya a utilizar para la comparación de los resultados. En nuestro caso, y como se explicará a continuación, utilizamos el método Bland-Altman. Para este método, el tamaño de la muestra debe ser lo suficientemente grande para permitir que los intervalos de confianza, se estimen con precisión, considerándose que una muestra de al menos 50 sujetos sería suficiente y una muestra mayor (100 o más sujetos), es la deseable (Cade et al., 2002).

Cálculo del tamaño muestral: CFC versus RD-7.

El tamaño muestral necesario para la validación de los CFC frente al RD-7, se calculó según las diferencias en la ingesta media de gluten entre los CFC y el RD-2, y la desviación máxima aceptada entre los resultados obtenidos de ambos métodos, que en nuestro caso establecimos en un 20%.

Validación

Para la validación, los participantes tuvieron que completar ambas herramientas: el CFC y uno de los registros alimentarios. Los primeros participantes completaron el CFC y al mes siguiente el RD-2 (un día entre semana y un día fin de semana). Una vez obtenidos estos resultados, se calculó la diferencia de ambos métodos y se calculó el número de participantes que debían completar el CFC y el RD-7. Éstos últimos lo hicieron de la misma manera que los primeros participantes, primero completaron el CFC y un mes después, el RD-7.

4.1.1 Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron mediante medias y desviaciones estándar. Para comprobar la concordancia entre los registros alimentarios y los CFC (CFC *versus* RD-2 y CFC *versus* RD-7), se utilizó el método de Bland-Altman, estratificando por grupos de edad (de 7 a 12 meses y de 13 a 36 meses). Se estimó el sesgo medio y los intervalos de concordancia al 95% del acuerdo entre ambas medidas. También, como una medida adicional de concordancia, se calculó para cada caso, el coeficiente de correlación de concordancia de Lin.

El método de Bland-Altman se considera el método estadístico más adecuado para la validación de CFC. Este método permite establecer

las diferencias en las mediciones de dos herramientas analíticas, y permite identificar si alguna de las herramientas utilizadas está subestimando o sobrestimando la medición, detectando posibles sesgos (Bland & Altman, 1999).

4.2. Análisis de la influencia de los factores ambientales de riesgo en el desarrollo de la enfermedad celiaca.

Los factores ambientales de riesgo que se analizaron fueron la cantidad y el tipo de gluten consumido. Tal y como se ha descrito anteriormente en la **Tabla 3**, este cálculo se hizo de manera prospectiva. De 4 a 6 meses de edad, unos sujetos recibieron gluten y otros placebo, de 7 a 10 meses, todos recibieron la misma cantidad de gluten y a partir de 11 meses, se permitió una ingesta libre. De modo que la cantidad y tipo de gluten consumida por cada sujeto participante se calculó a los 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 34 y 36 meses de edad, de, España, Hungría, Italia y Países Bajos. Mientras que en Alemania, se calculó a los 11, 12, 18, 24, 30 y 36 meses de edad.

4.2.1 Cantidad de gluten

- **Cantidad de gluten en cada producto**

Antes de calcular la ingesta de gluten de cada sujeto, se estimó en cada país la cantidad de gluten contenida de cada uno de los productos y, para evitar posibles sesgos, las dietistas-nutricionistas responsables en cada país, acordaron un método común de cálculo, que fue el mismo que para la validación de los CFC:

- Primero, se identificaron todas las marcas de productos con gluten disponibles en cada país.
- Una vez identificadas, se obtuvo la cantidad de proteínas vegetales contenidas en cada producto, de diferentes formas: etiquetas, tablas de composición de alimentos, páginas webs oficiales de las empresas, o contacto directo con las empresas.
- Una vez identificada la cantidad de proteínas vegetales, el cálculo del gluten se realizó de acuerdo al método generalmente aceptado de Overbeek et al. tal como se ha descrito en el apartado anterior:
- Finalmente se creó una base de datos común, diferenciada por países, en la que se incluyó la cantidad de gluten contenida en cada producto, por marca, porción consumida y país.

- **Cantidad de gluten consumida**

Para el registro de la cantidad de gluten consumida por cada sujeto, en los 3 centros de España se utilizaron los CFC (**Anexo II y III**), cuyo desarrollo y características se han descrito en el apartado anterior. El cálculo del consumo se realizó de forma centralizada por una dietista-nutricionista experta, en el centro de Valencia. En los Países bajos e Italia, también se utilizaron CFC, desarrollados y validados siguiendo la misma metodología que en España., (Hopman et al., 2007; Hopman et al., 2012). En el caso de Alemania y Hungría, el cálculo de la cantidad de gluten se hizo con el patrón de oro, un RD-7. Como los CFC de España, Italia y Países Bajos se validaron frente al patrón de oro, se considera que ambas herramientas, reportaron la misma información, de forma fiable y precisa.

Toda la información obtenida de los CFC y los RD-7, se registró en la base de datos ProMISe. La cantidad de gluten consumida por los sujetos de España, Italia y Países Bajos se calculó de manera centralizada en Valencia por una sola dietista-nutricionista, a partir de la información incorporada en ProMISe, esto es, cada país introducía la frecuencia de consumo de cada item (por ejemplo, 1 vez al día, menos de 2 veces a la semana, etc), indicada por los padres en los CFC; y a partir esta información y de la base datos de contenido de gluten de todos los productos previamente elaborada, se calculaba la ingesta media diaria de gluten (IMDG) de cada sujeto de estos tres

países. En el caso de Alemania y Hungría, al rellenar los sujetos un RD-7 en sus respectivos idiomas, las dietistas de cada país calculaban la IMDG, de acuerdo al método previamente establecido, y reportaban directamente, la cantidad total en ProMISe. De esta manera, se pudo exportar la IMDG de cada sujeto en cada mes, para los análisis estadísticos.

4.2.2 Tipo de gluten

Para analizar el tipo de gluten, se examinó el tipo de trigo utilizado - *Triticum aestivum* o *Triticum durum* - en la elaboración de los productos incluidos en la base de datos. Esta información se obtuvo de las etiquetas, ya que en algunos casos se indicaba el tipo de harina o trigo utilizado para la elaboración, o bien de las páginas webs oficiales de cada marca o por contacto directo con las empresas.

Tras el análisis, se incluyó en la base de datos, además de la cantidad de gluten contenida, el tipo de trigo utilizado. En todos los países, para la mayoría de productos, estaba disponible esta información, excepto en Alemania, por lo que para el análisis estadístico se excluyeron los datos de este país.

4.2.3 Análisis estadístico

Puesto que en Alemania, la información del tipo de gluten no estaba disponible, se decidió realizar dos análisis estadísticos diferentes, analizando las dos variables por separado.

- **Análisis estadístico 1**

El primer análisis estadístico se realizó para determinar si la cantidad de gluten consumida era un factor de riesgo en el desarrollo de EC.

- Las variables continuas se expresaron en medias y desviaciones estándar (SD, por sus siglas en inglés). Las variables categóricas se expresaron en frecuencias absolutas o relativas.
- Las IMDG entre países y entre los casos de EC y no-EC, se compararon usando un t-test, y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor $p < 0,05$.
- Los datos del consumo de gluten de los casos de EC, se recogieron sólo hasta el momento del diagnóstico. Posteriormente, estos individuos y su ingesta, no se consideraron para el análisis estadístico.
- Tras la exploración de los datos, se observó que el consumo de gluten no seguía una tendencia lineal, por lo tanto mediante un modelo de regresión segmentada, ajustado para cada individuo (*piecewise linear mixed model*), se estableció y definió el patrón de consumo de gluten, basado en la IMDG de cada individuo y de

cada país. El modelo definió y ajustó el patrón de consumo de gluten, incluyendo las siguientes variables como covariables: aumento progresivo del consumo de gluten de 11 a 18 meses (= pendiente inicial), IMDG a los 18 meses y por último, aumento progresivo del consumo de gluten de 18 a 36 meses (= pendiente final).

- Finalmente, para el análisis de riesgo de desarrollo de EC, se realizó un modelo de regresión de Cox multivariable de riesgos proporcionales (*Cox proportional hazards regression model*), ajustando para las siguientes variables: país, género, grupo de intervención (gluten o placebo), grupo de riesgo HLA, patrón de consumo de gluten (que incluía la cantidad total de gluten consumido de cada sujeto), y la interacción entre el grupo de riesgo HLA y el patrón de consumo de gluten.
- Los p valores de los modelos mixtos se estimaron utilizando la aproximación de Satterwaite, considerando diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos y gráficos, se realizaron con el R software (versión 3.1.2).

- **Análisis estadístico 2**

El segundo análisis estadístico se realizó para analizar si el tipo de gluten consumido (*Triticum aestivum* o *Triticum durum*) era un factor de riesgo en el desarrollo de EC. Para ello, se excluyó a Alemania del

análisis, puesto que esta información no estaba disponible. Este análisis se realizó de la misma manera que el anterior, con pequeñas variaciones:

- Las variables continuas se expresaron en medias y desviaciones estándar (SD, por sus siglas en inglés). Las variables categóricas se expresaron en frecuencias absolutas o relativas.
- Las IMDG de cada tipo de gluten, entre países y entre los casos de EC y no-EC, se compararon usando un t-test, y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor $p < 0,05$.
- Los datos de los casos de EC, se recogieron sólo hasta el momento del diagnóstico. Posteriormente, estos individuos y su ingesta, no se consideraron para el análisis estadístico.
- En el primer análisis, tras la exploración de los datos, se observó que el consumo total de gluten no seguía una tendencia lineal. De modo que para los diferentes tipos de gluten, también estimaron patrones de consumo, mediante un modelo de regresión segmentada, ajustado para cada individuo (*piecewise linear mixed model*), tomándose como referencia el trigo más agresivo, el *Triticum aestivum*. El modelo definió y ajustó el patrón de consumo de la misma manera que en el análisis anterior: aumento progresivo del consumo de *Triticum aestivum* de 11 a 18 meses (= pendiente inicial), IMDG de *Triticum aestivum* a los 18

meses y por último, aumento progresivo del consumo de *Triticum aestivum* de 18 a 36 meses (= pendiente final).

- Finalmente, para el análisis de riesgo de desarrollo de EC, se realizó un modelo de regresión de Cox multivariable de riesgos proporcionales (*Cox proportional hazards regression model*), ajustando para las siguientes variables: país, género, grupo de intervención (gluten o placebo), grupo de riesgo HLA, patrón de consumo de gluten (que incluía la cantidad total de cada tipo de gluten consumido de cada sujeto), y la interacción entre el grupo de riesgo HLA y el patrón de consumo del tipo de gluten consumido.
- Los p valores de los modelos mixtos se estimaron utilizando la aproximación de Satterwaite, considerando diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos y gráficos, se realizaron con el R software (versión 3.1.2)

4.3 Análisis de la subcohorte Española

La subcohorte Española del estudio PreventCD estaba compuesta por sujetos de procedentes de distintas áreas geográficas del país, controlados en 3 centros participantes de Valencia, Madrid y Reus.

En el análisis de la cohorte general, se observó que había diferencias significativas en el número de casos de EC entre los tres centros, por

lo que se decidió realizar un análisis de riesgo en la subcohorte Española, que fue seguida hasta que al menos todos los sujetos habían alcanzado la edad de 6 años.

Se realizó el mismo análisis estadístico que el descrito en el apartado de **Análisis estadístico 1**, pero simplificado, ya que el tamaño muestral era menor que el del análisis principal:

- Las variables continuas se expresaron en medias y desviaciones estándar (SD, por sus siglas en inglés). Las variables categóricas se expresaron en frecuencias absolutas o relativas.
- Las IMDG de cada tipo de gluten, entre centros de investigación y entre los casos de EC y no-EC, se compararon usando un t-test, y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor $p < 0,05$.
- Los datos de los casos de EC, se recogieron sólo hasta el momento del diagnóstico. Posteriormente, estos individuos y su ingesta, no se consideraron para el análisis estadístico.
- El análisis de riesgo de desarrollo de EC, se realizó mediante un modelo de regresión de Cox multivariable de riesgos proporcionales (*Cox proportional hazards regression model*), ajustando para las siguientes variables: ciudad, género, grupo de intervención (gluten o placebo), grupo de riesgo HLA y cantidad de gluten consumida.

Finalmente, se hizo análisis descriptivo detallado de las formas de debut de la EC en esta subpoblación y se estimó la prevalencia de la enfermedad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Desarrollo y validación de los cuestionarios de frecuencia de consumo.

1.1 Características de la muestra

La muestra del estudio piloto que completó el CFC y el RD-2, estaba compuesta por 342 sujetos, de los cuales 126 tenían entre 7 y 12 meses (73 niñas y 53 niños). Estos 126 niños se agruparon como grupo 1 y contribuyeron al desarrollo del CFC-1 (de 7 a 12 meses).

Los 216 sujetos restantes tenían entre 13 y 36 meses (123 niñas y 93 niños), y se agruparon como grupo 2, contribuyendo al desarrollo del CFC-2 (de 13 a 36 meses).

Todos los padres que participaron tenían al menos educación primaria, en el 65% de las familias al menos uno de los dos (padre o madre) tenían estudios superiores, y todos eran de raza caucásica.

En el caso de la muestra que completó el CFC y el RD-7, estaba compuesta por 45 sujetos, de los cuales 15 (8 niñas y 7 niños) tenían entre 7 y 12 meses, y 30 (19 niñas y 16 niños) tenían entre 13 y 36 meses. Las características de los padres eran similares a la de los anteriores, todos tenían al menos educación primaria, en el 52 % de los casos al menos uno de los padres (padre o madre) tenían estudios superiores), y todos eran de raza caucásica.

1.2. Resultados

- **Análisis Descriptivo**

En el caso de **grupo 1** (de 7 a 12 meses), la IMDG obtenida del RD-2 y el CFC-1 fue de 2,81 g/día y 2,67 g/día respectivamente. Las diferencias en la IMDG entre ambas herramientas, fue lo que se utilizó para determinar estadísticamente la muestra necesaria para validar el CFC-1 frente al patrón de oro, el RD-7, que fueron 15 niños. La IMDG obtenida del RD7- y el CFC-1 fue de 2,44 g/día y 2,47 g/día respectivamente.

En el caso del **grupo 2** (de 13 a 36 meses), la IMDG obtenida del RD-2 y el CFC-2 fue de 4,85 g/día y 5,68 g/día respectivamente. Las diferencias en la IMDG entre ambas herramientas, fue lo que se utilizó para determinar estadísticamente la muestra necesaria para validar el CFC-2 frente al patrón de oro, el RD-7, que fueron 30 niños. La IMDG obtenida del RD7- y el CFC-2 fue de 4,4 g/día y 4,15 g/día respectivamente.

Las IMDG obtenidas de los CFC, RD-2 y RD-7 de cada grupo de edad, se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Ingesta media diaria de gluten, obtenida de los RD-2, RD-7 y CFC en ambos grupos de edad (7-12 meses y 13-36 meses).

	Edad (meses)	n	RD-2 IMDG (SD)	RD-7 IMDG (SD)	CFC IMDG (SD)
RD-2	7 – 12	126	2,81 (1,66)	----	2,67 (1,11)
vs					
CFC-1	13 - 36	216	4,85 (2,19)	----	5,68 (1,99)
RD-7	7 – 12	15	----	2,44 (0,66)	2,47 (1,58)
vs					
CFC-2	13 - 36	30	----	4,40 (1,58)	4,15 (1,35)

N: número total de muestra; RD-2: Registro dietético de 2 días; RD-7: Registro dietético de 7 días; CFC: Cuestionario de Frecuencia de Consumo; IMDG: Ingesta media diaria de gluten; SD: Desviación estándar; CFC-1: Cuestionario de frecuencia de consumo de 7 a 12 meses; CFC-2: cuestionario de frecuencia de consumo de 13 a 36 meses.

Con los datos obtenidos de los CFC, se hizo un análisis adicional descriptivo, en el que se estableció en qué proporción cada grupo de alimento contribuye a la ingesta total de gluten y cómo evoluciona la ingesta de productos con gluten. Como se observa en la **Tabla 5**, el consumo de pan, pasta y “otros” (productos rebozados, pizza, etc), aumenta progresivamente con la edad, mientras que el consumo de cereales infantiles disminuye significativamente también con la edad.

Tabla 5. Contribución en porcentaje (%), de los diferentes grupos de alimentos, a la ingesta total de gluten, en diferentes meses de edad.

Meses* Producto	7-8	9-10	11-12	13-18	19-24	25-36
Cereales infantiles	60,67	53,86	52,19	24,34	18,26	13,01
Pan	24,86	23,4	16,54	28,0	35,40	40,21
Galletas	14,46	13,64	11,9	16,45	14,8	12,63
Pasta	0,00	0,25	1,20	3,40	6,40	8,70
Otros	0,00	8,85	18,17	27,8	25,13	25,45

* Se establecieron estos grupos de edad porque el consumo de los diferentes productos con gluten eran similar (sin diferencias significativas) en estos rangos de edad.

- **Análisis estadístico**

Como se ha descrito en la metodología, para comprobar la concordancia entre los registros alimentarios y los CFC, se utilizó el método de Bland-Altman, estimándose el sesgo medio y los intervalos de confianza (IC) al 95% del acuerdo entre ambas medidas. Y como medida adicional de concordancia, se calculó el coeficiente de correlación de concordancia de Lin.

El sesgo medio obtenido comparando el RD-2 y los CFC, fue de -0,14 g/día (Intervalo de concordancia del 95% [-0.30, 0.03]), en el grupo 1

(de 7 a 12 meses), y de 0,40 (Intervalo de concordancia del 95% [0.08, 0.71]), el grupo 2 (de 13 a 36 meses). Los intervalos de concordancia al 95% del acuerdo entre ambas medida, oscilaron entre -1,95 y 1,68 en el grupo 1 y de -4,23 a 5,03 en el grupo 2, es decir, que hubo un aumento evidente en los IC en el grupo 2. En la **Figura 12**, podemos ver representados gráficamente estos resultados.

Finalmente, los resultados obtenidos del coeficiente de correlación de Lin, fueron consistentes con los obtenidos mediante el método de Bland-Altman, $\rho = 0,76$ (Intervalo de concordancia 95% [0.67, 0.82]) para el grupo 1 (7 - 12 meses) y $\rho = 0,57$ (Intervalo de concordancia 95% [0.48, 0.65]), para el grupo 2 (13 – 36 meses).

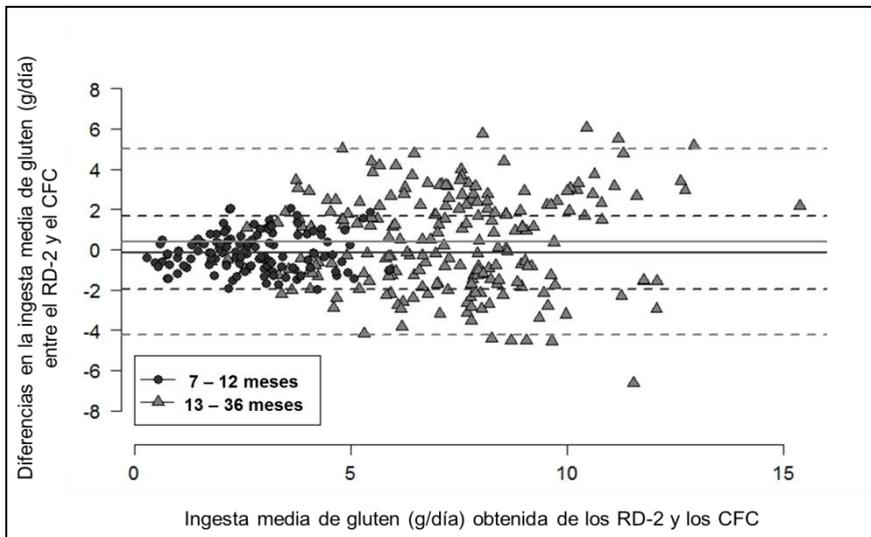


Figura 12. Gráfico de Bland-Altman de la ingesta media de gluten, evaluando la concordancia entre el RD-2 y el CFC.

Cuando se compararon los RD-7 y los CFC, el sesgo medio obtenido fue de 0,03 g/día (Intervalo de concordancia del 95% [-0.20, 0.27]), en el grupo 1 (de 7 a 12 meses), y de -0,25 (Intervalo de concordancia del 95% [-0.94, 0.44]), el grupo 2 (de 13 a 36 meses). Los IC al 95% del acuerdo entre ambas medida, oscilaron entre 0,80 y 0,87 en el grupo 1 y de -3,87 a 3,34 en el grupo 2, es decir, de la misma manera que en la validación frente al RD-2, hubo un aumento evidente en los IC en el grupo 2. En la **Figura 13**, podemos ver representados gráficamente estos resultados.

Finalmente, los resultados obtenidos del coeficiente de correlación de Lin, también fueron consistentes con los obtenidos mediante el método de Bland-Altman, $\rho=0,77$ (Intervalo de concordancia del 95% [0.45, 0.91]) para el grupo 1 y $\rho=0,21$ (Intervalo de concordancia del 95% [-0.15, 0.52]), para el grupo 2.

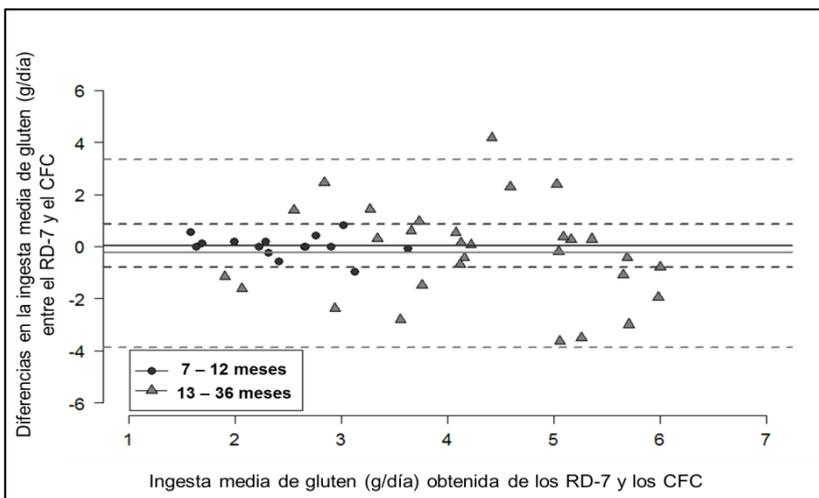


Figura 13. Gráfico de Bland-Altman de la ingesta media de gluten, evaluando la concordancia entre el RD-7 y el CFC. 126

Como era de esperar, y como se observa en la **Figura 13**, los límites de concordancia entre RD-7 y CFC, están más próximos a 0 en ambos grupos de edad, lo que indica que aunque la muestra sea más pequeña, los resultados obtenidos con los CFC se aproximan más a los obtenidos con el RD-7 que con el RD-2. Además, como ambos CFC se validan frente a las dos herramientas, se puede considerar que los resultados son representativos de la IMDG de niños con edades comprendidas entre 7 y 36 meses de edad.

1.3 Discusión

Hasta la fecha, estos dos CFC son las primeras herramientas desarrolladas y validadas en España para evaluar específicamente la ingesta de gluten en niños de 7 a 36 meses de edad. Si bien es cierto que los hábitos alimentarios pueden variar a lo largo de las diferentes comunidades autónomas y la población de estudio pertenecía solo a la Comunidad Valenciana, se considera que los productos con gluten disponibles en el mercado son los mismos en todo el país. Por lo tanto, se puede suponer que estos CFC pueden ser utilizados no solo en la Comunidad Valenciana, sino también para evaluar la ingesta de gluten de la población española general de 7 a 36 meses.

La validación de un CFC antes de utilizarlo en estudios epidemiológicos, es esencial para evitar falsas asociaciones entre factores dietéticos y enfermedades o marcadores relacionados con

enfermedades. Por lo tanto, los estudios de validación deben realizarse con el fin de analizar si el CFC que se va a utilizar, mide correctamente lo que queremos evaluar, y para ello debe comprobarse si los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos con un “patrón de oro”. En el caso de la evaluación de los hábitos alimentarios, se considera el patrón de oro un registro dietético de 7 días, ya que permite recoger todos los alimentos consumidos durante una semana. De modo que la información que se recoge es más precisa que, por ejemplo, en un RD-2. Sin embargo completar el RD-7 es más tedioso y muchas veces los sujetos no terminan de completarlo o no reflejan exactamente todo lo que comen, por eso, se ha comprobado que el RD-2 proporciona información suficiente y fiable de los hábitos alimentarios de las personas y es más fácil de cumplimentar (Cade et al., 2002; Kirkpatrick et al., 2014; Shim, Oh, & Kim, 2014).

Como se puede comprobar, en este estudio ambos CFC fueron validados con éxito frente a un RD-2 y un RD-7. Las diferencias obtenidas en la IMDG entre el CFC y el RD-7 no fueron significativas, lo que indica que estos CFC muestran perfectamente el gluten diario consumido en población pediátrica de 7 a 36 meses de edad. Además, los CFC serían mejor herramienta, en este caso, que un RD-2, especialmente a partir de los 13 meses, donde se incluye más

diversidad de alimentos que pueden no ser consumidos a diario lo que haría que con el RD-2 se subestimara este consumo de gluten.

Es importante destacar que la evaluación y cuantificación precisa de la ingesta de gluten en los primeros años de vida en población de riesgo de desarrollar EC es fundamental para poder establecer el verdadero rol del gluten en la etiopatogenia de la EC. Los estudios clásicos epidemiológicos basados en la llamada Epidemia Sueca, descrita en la introducción, sugerían que el consumo de grandes cantidades de gluten aumentaba el riesgo de EC antes de los 2 años. De acuerdo a los cálculos de la epidemia, se consideró que el aumento de los casos de EC entre 1987 y 1995, se debía entre otros factores, al aumento del consumo medio de gluten en niños menores de 2 años pero la estimación de la cantidad de gluten consumida, se calculó de manera retrospectiva, a partir de datos aproximados de consumo anual y del número de niños nacidos por año. Sin embargo, y como se verá a lo largo de este trabajo, esta hipótesis actualmente no se sostiene y se discute más en profundidad en el punto 2.5.

Por lo tanto, es necesario el desarrollo y uso de herramientas específicas y fáciles de usar, como las que hemos desarrollado, para llevar a cabo estudios prospectivos en población de riesgo que evalúen de forma precisa el verdadero papel de la cantidad de gluten en el desarrollo de EC, ya que hasta la fecha, la asociación del consumo de gluten y el riesgo de EC, se ha basado en estudios

retrospectivos (Ivarsson et al., 2000; Ivarsson, 2002; Ivarsson et al., 2005).

Hasta la fecha, no se han publicado CFC para evaluar específicamente la ingesta de gluten en otros países europeos, solo en los Países Bajos, donde los autores desarrollaron y validaron también dos CF, uno de 0 a 12 meses y otro de 1 a 4 años (Hopman et al., 2007; Hopman et al., 2012). Comparando nuestros resultados con los obtenidos en Holanda, vemos que la IMDG en ambos rangos de edad es superior a la ingesta de nuestros sujetos. La IMDG de 0 a 12 meses en Holanda es de 5,8 g/día frente a los 2,47 g/día en España de 7 a 12 meses. Y por otro lado, la IMDG de 12 a 48 meses en Holanda es de 7,2 g/día, frente a los 4,15 g/día en España de 13 a 36 meses. Sin embargo, el patrón de consumo sí que es similar en ambos países, en los dos casos observamos una disminución con la edad en el consumo de cereales infantiles y un aumento progresivo del consumo de pan y pasta, mientras que el consumo de galletas aunque aumenta ligeramente, se mantienen más o menos constante en ambos grupos de edad.

Por lo tanto, esta herramienta, además de poder utilizarse en estudios prospectivos para establecer el papel del gluten en el desarrollo de EC en población pediátrica de riesgo, también puede utilizarse para comparar los hábitos alimentarios de consumo de gluten de la

población general pediátrica española con los hábitos de otros países en poblaciones similares.

Estos resultados han sido publicados (Crespo Escobar et al., 2015).

2. Cantidad de gluten consumida y riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.

2.1 Características de la muestra

Como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, los sujetos de este estudio, pertenecían a la cohorte del Proyecto Europeo PreventCD. De los 944 sujetos que se incluyeron en el PreventCD, se seleccionaron solo aquellos que tenían disponibles los datos del consumo de gluten hasta los 36 meses, que fueron un total de 715 sujetos, de Alemania, España, Hungría, Italia y Países Bajos, correspondiendo estos sujetos al total de los individuos reclutados en estos países. Los sujetos no incluidos, pertenecían a países que no registraron la ingesta de gluten de forma regular.

Los sujetos incluidos pertenecían a diferentes áreas geográficas de cada país, no solo a la ciudad en la que se encontraba el Hospital participante, En el momento del análisis, todos habían cumplido 5 años y 587 (83,5%), tenían 6 años. En la **Tabla 6**, se muestran las características generales de la población incluida en el estudio.

Tabla 6. Características de la población de estudio.

País	n*	Grupo de intervención [#] Gluten / Placebo	Género M / F	Grupo de HLA de riesgo [†]					Casos de EC [§]	Edad de diagnóstico < 2 años(>2 años)**
				Grupo 1 n / EC (%)	Grupo 2 n / EC (%)	Grupo 3 n / EC (%)	Grupo 4 n / EC (%)	Grupo 5 n / EC (%)		
Alemania	100 (95)	48 / 52	59 / 41	13/4 (30)	6/0 (0)	48/6 (12)	7/0 (0)	26/1 (3)	11	0 (100)
España	225 (202)	116 / 109	125 / 100	51/13 (25)	18/2 (11)	98/9 (9)	11/0 (0)	47/0 (0)	24	41,6 (58,4)
Hungría	135 (83)	68 / 67	65 / 70	21/8 (38)	11/3 (27)	69/11 (16)	7/0 (0)	27/2 (7)	24	4 (96)
Italia	128 (104)	62 / 66	64 / 64	12/5 (41)	28/3 (10)	45/7 (15)	3/1 (33)	40/2 (5)	18	33 (67)
Países Bajos	127 (113)	63 / 64	63 / 64	16/2 (12)	8/3 (37)	78/10 (13)	4/1 (25)	21/2 (9)	18	22 (78)
Total	715 (597)	357 / 358	376 / 339	113/32 (28)	71/11 (15)	338/43 (13)	32/2 (6)	161/7 (4)	95	---

M: masculino; F: Femenino; EC: Enfermedad Celiaca. * Número total de niños incluidos en el estudio por país. Entre paréntesis, el número de niños que tenían 6 años en el momento del análisis. #Número total de niños que recibieron gluten o placebo durante el periodo de intervención (de 4 a 6 meses). [†] Los valores representan el número total de niños de cada grupo HLA por país / el número total de niños que desarrollaron EC en cada grupo de HLA específico y entre paréntesis el porcentaje que representan los casos de EC, respecto al número total de cada grupo de HLA. El grupo 1 incluye los haplotipos DQ2.5/DQ2.5 y DQ2.5/DQ2.2; grupo 2: DQ2.2/DQ7; grupo 3: DQ2.5/DQ7, DQ2.5/DQ8, y DQ2.5/otro; grupo 4: DQ2.2/DQ2.2, DQ2.2/DQ8, y DQ8/DQ8; grupo 5 DQ2.2/otro, DQ8/DQ7, y DQ8/otro. [§] Número de casos diagnosticados de EC en el momento del análisis. **Porcentaje de casos de EC diagnosticados antes y después de los 2 años de edad.

2.2 Consumo de gluten en la población de estudio.

2.2.1 Cohorte general

Primero, se hizo un análisis descriptivo de la ingesta media de gluten (IMDG) por país. Como se ha explicado en apartados anteriores, de acuerdo al protocolo del estudio principal, todos los sujetos tuvieron un consumo fijo y pautado de gluten entre los 6 y 10 meses. Sin embargo, a partir de los 11 meses, cuando se permitió un consumo de gluten libre, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la comparación múltiple entre todos los países y a todas las edades ($p < 0,001$), excepto entre los Países Bajos y Hungría a los 11 meses ($p = 0,85$). En general, la IMDG significativamente más baja a cualquier edad se registró en España, mientras que el consumo más alto se registró en Hungría hasta los 24 meses y a partir de los 24, el consumo más alto se obtuvo en Italia.

Uno de los datos más destacables, es que todos partían del mismo consumo de gluten por protocolo a los 10 meses, 1,5 g, y cuando se dejó el consumo libre, en Países Bajos y Hungría, este consumo se cuadruplicó, pasando de 1,5 g a 5,2 g. En Italia también aumentó bruscamente pero menos que en los dos países anteriores, pasando de 1,5 g a 4,8. En cambio en Alemania y España, este aumento fue más moderado, pasando de 1,5 a 3,7 y 2,5 respectivamente. Todos los datos de IMDG a cualquier edad se muestran en la **Tabla 7**.

Por otro lado, tras la exploración y representación inicial de los datos, observamos que, aunque había diferencias en la cantidad de gluten consumida entre países, en general todos seguían un patrón de consumo similar, independientemente de la cantidad: un aumento brusco de la ingesta entre los 11 y 18 meses, dando lugar a una pendiente de consumo pronunciada, y un aumento más moderado en el consumo entre los 18 y 36 meses, excepto en Italia, donde el consumo de gluten continúa aumentando significativamente a partir de los 18 meses. De modo que, con estos datos, se realizó un modelo de regresión segmentada, ajustado para cada individuo, se estableció y definió el patrón de consumo de gluten, basado en la IMDG de cada individuo y de cada país, cuyos resultados se muestran también en la **Tabla 7** y se representan gráficamente en la **Figura 14**.

En general, España presentó la pendiente inicial y la IMDG a los 18 meses, más baja y un aumento insignificante en la IMDG a partir de 18 meses, siendo la pendiente final estimada cero. En contraposición, Hungría presentó la pendiente inicial más pronunciada y la IMDG a los 18 meses más alta. Por último, la pendiente final más pronunciada la encontramos en Italia. De manera global hubo diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes iniciales de todos los países, y la IMDG a los 18 meses ($p < 0,001$).

Tabla 7. Ingesta media diaria de gluten por país y patrón de consumo de gluten estimado y ajustado mediante un modelo de regresión segmentada.

País Meses	Alemania		España		Hungría		Italia		Países Bajos	
	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]
11	3,72 (1,8)	0,38 [†] IC 95% [0,26, 0,50]	2,55 (1,27)	0,21 [†] IC 95% [0,15, 0,26]	5,20 (3,39)	0,64 [†] IC 95% [0,54, 0,74]	4,85 (2,16)	0,60 [†] IC 95% [0,50, 0,70]	5,27 (2,15)	0,33 [†] IC 95% [0,23, 0,43]
12	4,31 (2,11)		3,14 (1,49)		7,07 (3,91)		5,43 (2,92)		6,36 (2,53)	
14	ND		3,45 (1,43)		7,56 (4,19)		7,93 (2,99)		7,68 (2,49)	
16	ND		3,87 (1,73)		9,27 (4,05)		5,80 (3,35)		7,69 (2,42)	
18	6,55 (2,68)	6,51 [#] IC 95% [6,18, 6,89]	4,01 (1,72)	4,25 [#] IC 95% [4,15,4,47]	10,92 (4,25)	10,27 [#] IC 95% [10,08,10,45]	8,81 (3,9)	8,87 [#] IC 95% [8,43, 8,99]	8,04 (2,54)	8,17 [#] IC 95% [7,95,8,35]
20	ND	0,06* IC 95% [0,01, 0,11]	4,20 (1,94)	0* IC 95% [-0,01,0,03]	9,35 (4,36)	0,03* IC 95% [-0,01, 0,07]	9,76 (4,01)	0,20* IC 95% [0,15, 0,25]	8,52 (2,44)	0,04* IC 95% [0, 0,08]
22	ND		4,15 (1,98)		10,39 (3,96)		8,93 (3,40)		8,30 (2,69)	
24	6,86 (3,02)		4,37 (1,87)		11,25 (4,01)		10,78 (3,94)		8,09 (2,73)	
28	ND		4,20 (1,84)		10,01 (3,55)		11,82 (3,66)		8,60 (2,69)	
30	6,96 (2,87)		4,15 (1,77)		10,61 (3,46)		12,37 (3,96)		8,77 (2,78)	

Tabla 7 (continuación). Ingesta media diaria de gluten por país y patrón de consumo de gluten estimado y ajustado mediante un modelo de regresión segmentada.

País Meses	Alemania		España		Hungría		Italia		Países Bajos	
	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]	IMDG (SD)	Estimación [IC 95%]
34	ND	0,06* IC 95% [0,01, 0,11]	4,46 (1,92)	0* IC 95% [-0,01,0,03]	10,96 (3,38)	0,03* IC 95% [-0,01, 0,07]	11,51 (3,73)	0,20* IC 95% [0,15, 0,25]	8,85 (2,50)	0,04* IC 95% [0, 0,08]
36	7,8 (3,94)		4,39 (1,85)		11,51 (3,33)		12,10 (3,22)		9,19 (2,92)	

IMDG: Ingesta Media Diaria de Gluten (g/día); SD: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza; ND: Datos no disponibles. †: Aumento del consumo de gluten (g/mes) de la pendiente inicial (11-18 meses); #: Ingesta media diaria de gluten estimada a los por método al os 18 meses; *: Aumento del consumo de gluten (g/mes) de la pendiente final (18-36 meses).

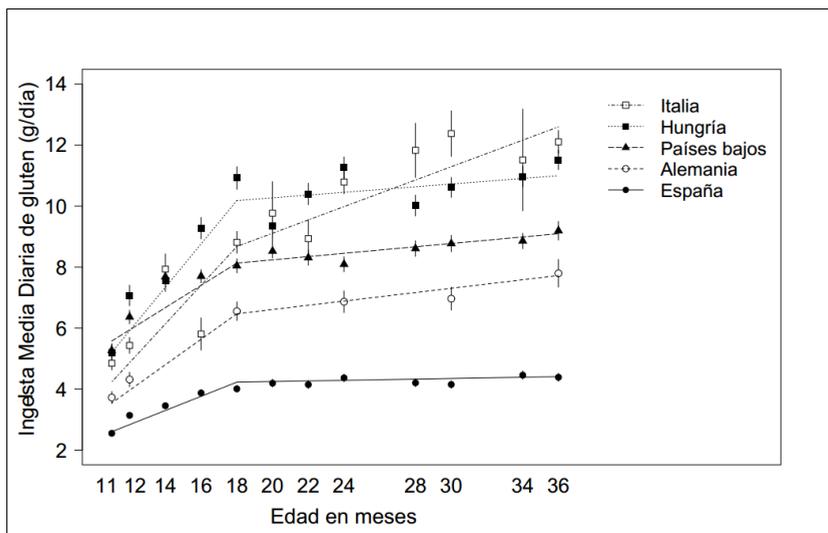


Figura 14. Representación de la ingesta media diaria de gluten (g/día) y del patrón de consumo, definido por una pendiente inicial (de 11 a 18 meses), un consumo de gluten estimado a los 18 meses y una pendiente final (de 18 a 36 meses), para cada país.

2.2.2 Grupo de intervención

Se hizo un análisis comparativo del consumo de gluten entre aquellos sujetos que recibieron gluten *versus* placebo durante el periodo de intervención (de 4 a 6 meses), y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, ni en la comparación entre grupos del mismo país, ni en la comparación global (grupo gluten *versus* gluten placebo, independientemente del país) ($p > 0,05$). Los resultados de la comparación de ambos grupos por país se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Ingesta media diaria de gluten por grupo de intervención (gluten o placebo)* y mes.

País Grupo Mes	Alemania		España		Hungría		Italia		Países Bajos	
	Gluten	Placebo	Gluten	Placebo	Gluten	Placebo	Gluten	Placebo	Gluten	Placebo
	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)
11	4,07 (2,08)	3,48 (1,51)	2,49 (1,08)	2,71 (1,42)	6,21 (3,37)	6,00 (3,07)	5,22 (2,15)	4,66 (2,23)	5,23 (2,17)	5,32 (2,16)
12	4,79 (2,32)	4,00 (1,93)	3,06 (1,31)	3,33 (1,65)	8,19 (3,59)	7,71 (3,88)	5,12 (3,03)	5,36 (2,77)	6,43 (2,36)	6,35 (2,70)
14	ND	ND	3,50 (1,33)	3,58 (1,52)	8,21 (3,01)	8,66 (8,51)	8,71 (3,29)	7,19 (2,67)	7,49 (2,40)	7,85 (2,60)
16	ND	ND	3,96 (1,67)	3,97 (1,78)	10,05 (3,85)	10,19 (8,19)	5,98 (3,85)	5,71 (3,23)	7,41 (2,47)	8,02 (2,38)
18	6,74 (2,88)	6,42 (2,50)	4,15 (1,79)	3,99 (1,67)	11,87 (3,85)	11,61 (3,05)	9,10 (4,37)	8,30 (3,49)	8,13 (2,46)	8,04 (2,59)
20	ND	ND	4,33 (2,17)	4,16 (1,67)	10,68 (3,99)	9,73 (3,08)	9,74 (3,25)	10,74 (3,85)	8,66 (2,45)	8,39 (2,45)
22	ND	ND	4,33 (2,19)	4,03 (1,70)	11,49 (3,45)	10,96 (3,87)	9,43 (3,75)	8,00 (3,41)	8,6 (2,71)	8,11 (2,61)
24	7,01 (3,38)	6,81 (2,69)	4,44 (1,7)	4,37 (2,07)	12,79 (3,44)	11,37 (3,81)	11,18 (3,79)	10,74 (4,12)	8,69 (2,19)	7,53 (3,10)
28	ND	ND	4,21 (1,88)	4,15 (1,83)	10,79 (3,31)	10,10 (3,10)	12,40 (1,82)	12,38 (3,64)	8,85 (2,29)	8,47 (2,98)

Tabla 8 (continuación). Ingesta media diaria de gluten por grupo de intervención (gluten o placebo)* y mes.

País	Alemania		España		Hungría		Italia		Países Bajos	
	Gluten	Placebo	Gluten	Placebo	Gluten	Placebo	Gluten	Placebo	Gluten	Placebo
	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)
30	6,88 (2,76)	7,15 (3,06)	4,11 (1,82)	4,15 (1,75)	11,25 (3,16)	10,83 (7,22)	12,11 (3,03)	12,99 (3,43)	9,26 (2,33)	8,40 (3,04)
34	ND	ND	4,49 (1,91)	4,36 (1,98)	11,41 (3,05)	10,53 (3,66)	10,68 (3,45)	10,96 (4,90)	8,75 (2,41)	9,08 (2,49)
36	7,51 (3,93)	8,14 (4,05)	4,42 (1,80)	4,35 (1,95)	12,05 (3,18)	11,83 (3,92)	12,57 (3,48)	11,51 (2,97)	9,53 (2,64)	8,99 (3,07)

IMDG: Ingesta Media Diaria de Gluten (g/día); SD: Desviación estándar; ND: Datos no disponibles. *La IMDG global del grupo que recibió placebo fue 0,28 g/día menos que la IMDG del grupo que recibió gluten [IC del 95% (-0.56, 0.01), p = 0,06].

2.2.3 Género

También se hizo un análisis comparativo del consumo de gluten entre niños y niñas, y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, ni en la comparación entre géneros del mismo país, ni en la comparación global (niños *versus* niñas, independientemente del país) ($p > 0,05$). La IMDG global de los niños fue 0,27 g/día más que las niñas, [IC del 95% (-0.01, 0.56), $p = 0,06$].

Los resultados de la comparación de ambos grupos por país se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Ingesta media diaria de gluten por género (masculino o femenino) y mes.

País Género Mes	Alemania		España		Hungría		Italia		Países Bajos	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)
11	4,07 (2,08)	3,48 (1,51)	2,49 (1,08)	2,71 (1,42)	6,21 (3,37)	6,00 (3,07)	5,22 (2,15)	4,66 (2,23)	5,23 (2,17)	5,32 (2,16)
12	4,79 (2,32)	4,00 (1,93)	3,06 (1,31)	3,33 (1,65)	8,19 (3,59)	7,71 (3,88)	5,12 (3,03)	5,36 (2,77)	6,43 (2,36)	6,35 (2,70)
14	ND	ND	3,50 (1,33)	3,58 (1,52)	8,21 (3,01)	8,66 (8,51)	8,71 (3,29)	7,19 (2,67)	7,49 (2,40)	7,85 (2,60)
16	ND	ND	3,96 (1,67)	3,97 (1,78)	10,05 (3,85)	10,19 (8,19)	5,98 (3,85)	5,71 (3,23)	7,41 (2,47)	8,02 (2,38)
18	6,74 (2,88)	6,42 (2,50)	4,15 (1,79)	3,99 (1,67)	11,87 (3,85)	11,61 (3,05)	9,10 (4,37)	8,30 (3,49)	8,13 (2,46)	8,04 (2,59)
20	ND	ND	4,33 (2,17)	4,16 (1,67)	10,68 (3,99)	9,73 (3,08)	9,74 (3,25)	10,74 (3,85)	8,66 (2,45)	8,39 (2,45)
22	ND	ND	4,33 (2,19)	4,03 (1,70)	11,49 (3,45)	10,96 (3,87)	9,43 (3,75)	8,00 (3,41)	8,6 (2,71)	8,11 (2,61)
24	7,01 (3,38)	6,81 (2,69)	4,44 (1,7)	4,37 (2,07)	12,79 (3,44)	11,37 (3,81)	11,18 (3,79)	10,74 (4,12)	8,69 (2,19)	7,53 (3,10)
28	ND	ND	4,21 (1,88)	4,15 (1,83)	10,79 (3,31)	10,10 (3,10)	12,40 (1,82)	12,38 (3,64)	8,85 (2,29)	8,47 (2,98)

Tabla 9 (continuación). Ingesta media diaria de gluten por género (masculino o femenino) y mes.

País Género Mes	Alemania		España		Hungría		Italia		Países Bajos	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)
30	6,88 (2,76)	7,15 (3,06)	4,11 (1,82)	4,15 (1,75)	11,25 (3,16)	10,83 (7,22)	12,11 (3,03)	12,99 (3,43)	9,26 (2,33)	8,40 (3,04)
34	ND	ND	4,49 (1,91)	4,36 (1,98)	11,41 (3,05)	10,53 (3,66)	10,68 (3,45)	10,96 (4,90)	8,75 (2,41)	9,08 (2,49)
36	7,51 (3,93)	8,14 (4,05)	4,42 (1,80)	4,35 (1,95)	12,05 (3,18)	11,83 (3,92)	12,57 (3,48)	11,51 (2,97)	9,53 (2,64)	8,99 (3,07)

M: Masculino; F: Femenino; IMDG: Ingesta Media Diaria de Gluten (g/día); SD: Desviación estándar; ND: Datos no disponibles.

2.2.4 Casos diagnosticados de EC y no-EC

El último análisis comparativo de la ingesta de gluten que se realizó, fue el de la IMDG entre los casos diagnosticados de EC y los casos no-EC. Tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, ni en la comparación entre casos por países, ni en la comparación global (casos diagnosticados de EC *versus* no-EC, independientemente del país) ($p>0,05$).

Los resultados de la comparación de ambos grupos por país, se muestran en la **Tabla 10**, y la representación gráfica de los mismos en la **Figura 15**.

Tabla 10. Ingesta media diaria de gluten por casos (diagnosticados de enfermedad celiaca y casos sanos) y mes.

País Cayos Mes	Alemania		España		Hungría		Italia		Países Bajos	
	EC	no-EC	EC	no-EC	EC	no-EC	EC	no-EC	EC	no-EC
	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)
11	3.19 (1.46)	3.78 (1.82)	2.59 (1.55)	2.56 (1.25)	4.9 (2.30)	5.25 (3.53)	4.80 (1.57)	4.86 (2.24)	4.76 (1.93)	5.34 (2.15)
12	3.73 (1.97)	4.35 (2.13)	3.36 (1.68)	3.12 (1.47)	6.89 (2.98)	7.14 (4.06)	6.01 (2.96)	5.43 (2.90)	6.32 (2.16)	6.37 (2.54)
14	ND	ND	3.62 (1.35)	3.44 (1.45)	8.16 (4.37)	7.37 (4.10)	7.52 (2.26)	7.99 (3.13)	8.70 (3.01)	7.55 (2.39)
16	NA	NA	3.91 (2.00)	3.87 (1.72)	9.25 (3.21)	9.17 (4.15)	6.64 (3.39)	5.74 (3.39)	7.53 (1.83)	7.72 (2.50)
18	7.80 (4.52)	6.42 (2.44)	4.14 (2.00)	4.00 (1.71)	11.05 (4.35)	10.74 (4.25)	9.68 (4.03)	8.70 (3.89)	8.07 (2.79)	8.03 (2.56)
20	ND	ND	3.88 (1.65)	4.19 (1.95)	8.56 (4.56)	9.39 (4.33)	8.57 (5.82)	10.20 (3.39)	8.37 (2.57)	8.50 (2.49)
22	ND	ND	4.22 (1.73)	4.13 (2.00)	9.82 (3.28)	10.44 (4.09)	7.10 (4.18)	9.07 (3.39)	8.27 (2.68)	8.33 (2.75)
24	9.17 (4.35)	6.65 (2.83)	4.82 (3.07)	4.33 (1.77)	10.50 (3.80)	11.39 (4.05)	13.07 (4.08)	10.60 (3.86)	8.64 (1.85)	8.01 (2.80)
28	ND	ND	4.25 (2.33)	4.19 (1.83)	9.82 (4.06)	10.11 (3.5)	13.98 (0)	11.69 (3.74)	7.61 (2.83)	8.68 (2.65)

Tabla 10 (continuación). Ingesta media diaria de gluten por casos (diagnosticados de enfermedad celiaca y no diagnosticados) y mes.

País Casos Mes	Alemania		España		Hungría		Italia		Países Bajos	
	EC	no-EC	EC	no-EC	EC	no-EC	EC	no-EC	EC	no-EC
	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)	IMDG(SD)
30	7.45 (3.45)	6.89 (2.75)	5.85 (2.36)	4.11 (1.74)	9.45 (2.52)	10.79 (3.49)	12,11 (3,03)	12,99 (3,43)	9.15 (2.23)	8.75 (2.84)
34	ND	ND	5.77 (2.61)	4.42 (1.90)	10.78 (3.34)	11.01 (3.37)	10,68 (3,45)	10,96 (4,90)	9.19 (1.8)	8.82 (2.57)
36	8.17 (4.16)	7.73 (3.91)	6.10 (4.11)	4.34 (1.76)	10.84 (3.03)	11.61 (3.47)	12,57 (3,48)	11,51 (2,97)	7.39 (3.10)	9.36 (2.81)

EC: casos diagnosticados de EC; no-EC: casos no diagnosticados de EC; IMDG: Ingesta Media Diaria de Gluten (g/día); SD: Desviación estándar; ND: Datos no disponibles.

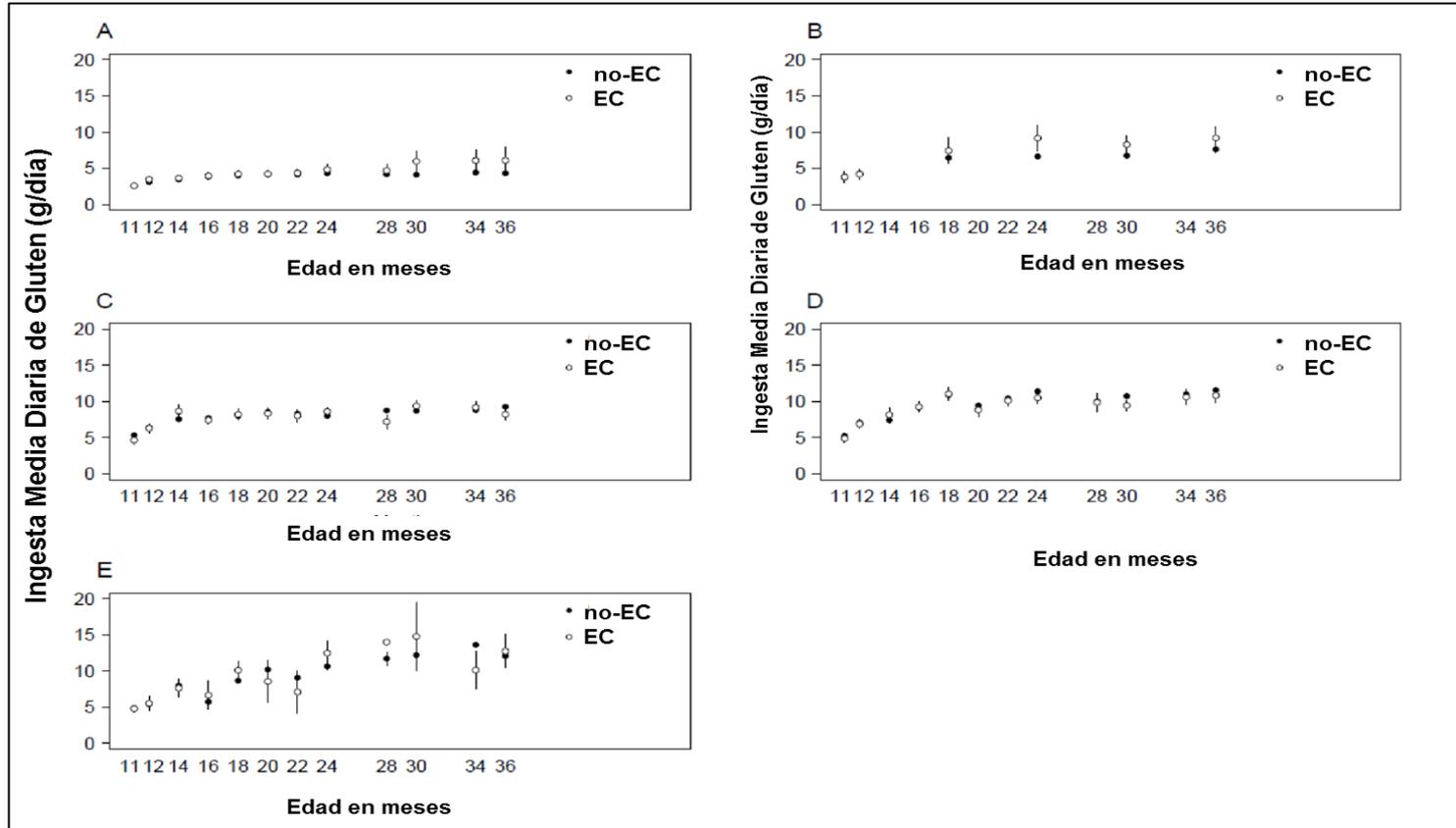


Figura 15. Ingesta media diaria de gluten y SD (líneas verticales) en casos diagnosticados de EC y no-EC, por país y mes.

A: España, B: Alemania, C: Países Bajos; D: Hungría; E: Italia.

2.3 Cantidad de gluten consumida y riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.

Para analizar el impacto de las diferentes variables en el desarrollo de la EC, se ajustó un modelo de regresión lineal de Cox, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC.

Variable	RR (IC 95%) [†]	p-valor [#]
País		
Alemania	1.0 (Referencia)	---
España	0.62 (0.21, 1.79)	0.37
Hungría	1.03 (0.35, 2.99)	0.96
Italia	0.42 (0.11, 1.61)	0.21
Países Bajos	1.03 (0.36, 2.94)	0.96
Género		
Femenino	1.0 (Referencia)	--
Masculino	0.66 (0.38, 1.16)	0.22
Grupo de intervención		
Gluten	1.0 (Referencia)	--
Placebo	0.86 (0.49, 1.50)	0.59

Tabla 11 (continuación). Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC.

Variable	RR (IC 95%) [†]	p-valor [#]
Grupo de Riesgo HLA		
Grupo 1	1.0 (Referencia)	--
Grupo 2	0.35 (0.11, 1.01)	0.07
Grupo 3	0.19 (0.08, 0.46)	<0.001*
Grupo 4	0.35 (0.11, 1.10)	0.40
Grupo 5	0.18 (0.05, 0.68)	0.01*
Patrón de consumo de gluten		
Pendiente inicial	1.0 (Referencia)	--
IMDG estimada a los 18 m	0.98 (0.89, 1.09)	0.76
Pendiente final	1.17 (0.59, 2.31)	0.66
Interacción de las variables		
Pendiente inicial : grupo HLA 1	1.0 (Referencia)	--
Pendiente inicial : grupo HLA 2	5.81 (1.18, 28.74)	0.031*
Pendiente inicial : grupo HLA 3	2.31 (0.63, 8.4)	0.20
Pendiente inicial : grupo HLA 4	0.04 (0.01, 2.19)	0.11
Pendiente inicial : grupo HLA 5	1.18 (0.14, 9.63)	0.88

RR: Ratio de Riesgo; IC: Intervalo de confianza; †: Ratio de Riesgo de cada variable asociado al riesgo de desarrollo de EC. # Los p valores para los modelos mixtos se estimaron utilizando la aproximación de Satterthwaite.

* p valores considerados estadísticamente significativos.

En este análisis se obtuvieron los ratios de riesgo (HR) para cada variable incluida en el modelo. Las variables país, género y grupo de intervención no mostraron una asociación significativa con el riesgo de desarrollo de EC (p valores de los de los HR = 0,40, 0,22 y 0,59, respectivamente).

La variable patrón de consumo de gluten, que incluye a su vez la cantidad de gluten consumida, definida como pendiente inicial, IMDG y pendiente final, tampoco mostró asociación significativa con el riesgo de desarrollo de EC. Solo las variables grupo HLA 3 y 5 mostraron asociación significativa, presentando un menor riesgo de desarrollo de EC, comparado con el grupo HLA 1, que era el grupo de referencia (p valores de los HR = <0,001 y 0,01 respectivamente).

Finalmente, este análisis también incluía la interacción entre el patrón de consumo de gluten y el grupo de riesgo HLA, Como se observa en la **Tabla 11**, el riesgo de desarrollo de EC en los grupos HLA 1, 3, 4 y 5, no mostró una interacción significativa con el patrón de consumo de gluten (los p valores de los HR = 0,99, 0,11, 0,2 y 0,88, respectivamente). Sin embargo, el grupo de riesgo HLA 2 (DQ2.2/DQ7), sí que mostró una interacción significativa con este patrón de consumo, concretamente con la pendiente inicial. De modo que, cuanto más brusco aumenta el consumo de gluten de mes a mes entre los 11 y 18 meses (es decir, cuanto más pronunciada es la

pendiente inicial), mayor es el riesgo de desarrollo de EC en los sujetos con el haplotipo HLA-DQ2.2/DQ7 (el p valor del HR = 0,03).

Los resultados de la interacción del patrón de consumo de gluten el grupo de riesgo HLA, se representan gráficamente en la **Figura 16**. En esta figura, podemos observar como el grupo de riesgo HLA 1 (que incluye los sujetos homocigotos), parte de un riesgo de EC superior al resto de grupos HLA, y este riesgo no se ve modificado por el patrón de consumo de gluten (pendiente inicial). Lo mismo ocurre para los grupos HLA 3, 4 y 5, que parten de un riesgo inferior, pero tampoco se ve afectado por el patrón de consumo de gluten. Sin embargo, para el grupo HLA 2, vemos como parte de un riesgo de desarrollo de EC inferior al grupo HLA-1, pero a medida que aumenta la pendiente inicial del consumo de gluten (IMDG entre 11-18 meses), también aumenta el riesgo, llegando incluso a tener un riesgo similar al del grupo HLA 1.

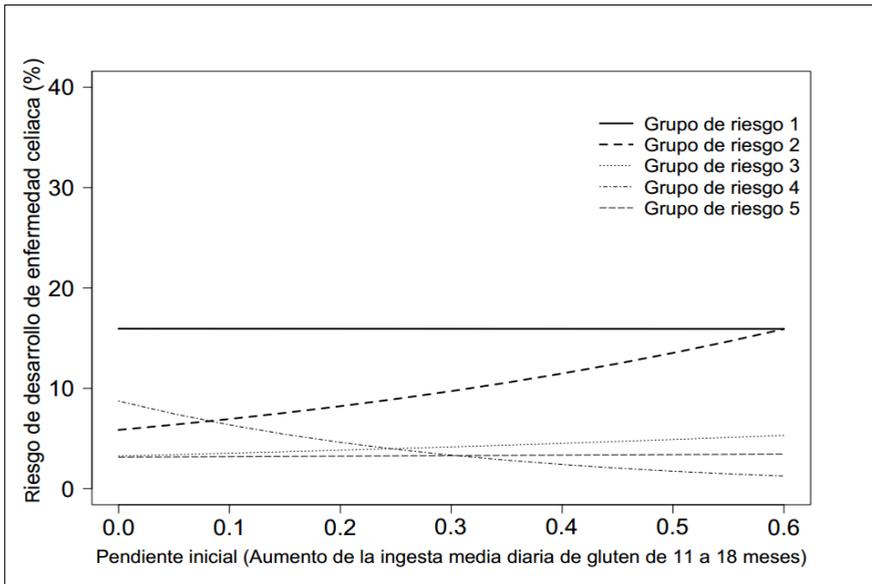


Figura 16. Representación gráfica de la interacción de las variables “pendiente inicial” (Ingesta media diaria de gluten de 11 a 18 meses) y grupo de riesgo HLA. El grupo 1 incluye los haplotipos DQ2.5/DQ2.5 y DQ2.5/DQ2.2; el grupo 2 incluye DQ2.2/DQ7; el grupo 3 incluye DQ2.5/DQ7, DQ2.5/DQ8, y DQ2.5/otro; e grupo 4 incluye DQ2.2/DQ2.2, DQ2.2/DQ8, y DQ8/DQ8; y el grupo 5 DQ2.2/otro, DQ8/DQ7, y DQ8/otro.

2.4 Características genotípicas de los casos diagnosticados de enfermedad celíaca.

En vista de los resultados del riesgo de desarrollo de EC, se hizo de forma adicional un análisis descriptivo de los grupos de riesgo HLA de los casos diagnosticados de EC y de la edad de diagnóstico. Como se observa en la **Tabla 6**, si analizamos cómo contribuye cada genotipo HLA específico al total de los casos diagnosticados de EC

por país, podemos observar que en España, el grupo de mayor riesgo (grupo HLA 1), representa el 54% del total de los casos, y a la vez, coincide con que España tiene la mayor proporción de casos diagnosticados antes de los 2 años de edad. Sin embargo, en Alemania el 36% de los casos son DQ2 homocigotos (grupo HLA 1), pero todos los niños son diagnosticados más tarde de los 2 años, lo que sugiere la influencia de factores, posiblemente ambientales pero diferentes a la cantidad de gluten, que contribuyan al desarrollo de la EC.

2.5 Discusión

El principal hallazgo de este estudio, es que la cantidad de gluten consumida entre los 11 y 36 meses de edad, no es un factor de riesgo en el desarrollo de EC hasta los 6 años de edad, en una cohorte de riesgo Europea. Estos datos son similares a los obtenidos en el estudio previo de nuestro grupo, PreventCD, que mostraba los resultados del riesgo de desarrollo de EC pero solo hasta los 3 años de edad (Vriezinga et al., 2014). Estudios epidemiológicos demuestran que el porcentaje de pacientes que se diagnostica entre los 3 y 6 años es mayor que en los menores de 3 años (Telega G, Bennet T & Werlin S, 2008; Lurz et al., 2009; Savilahti et al., 2010)

Aunque hubo diferencias estadísticamente significativas en la IMDG entre países, el consumo de los casos que desarrollaron EC y los que

no, fue similar. Además, el análisis de riesgo mostró que esta variable no presentó una asociación significativa con el desarrollo de EC. Asimismo, si el consumo de grandes cantidades de gluten durante los primeros años aumentara el riesgo de desarrollo de EC, como se ha sugerido en los últimos años, cabría esperar que España tuviese la menor incidencia de EC, ya que presenta el consumo de gluten más bajo, y Hungría e Italia, con el consumo de gluten más alto, tuviesen mayor incidencia de EC, hecho que no ocurre.

Nuestros resultados difieren de estudios previos, basados en la Epidemia Sueca, que sugerían que el consumo de grandes cantidades de gluten en el momento de la introducción, aumentaba la incidencia de EC antes de los 2 años. Este aumento de los casos de EC que se observó entre 1987 y 1995 (años de la epidemia), se atribuyó principalmente a tres factores importantes: cambio en las recomendaciones de edad de introducción del gluten, disminución de la duración de la lactancia materna, y por último aumento del consumo de harinas con gluten en niños menores de 2 años, que se duplicó durante los años de la epidemia, pasando de 25 gramos de harinas con gluten en los años previos a 47 gramos durante la epidemia. Sin embargo, como se ha explicado en la discusión de los resultados anteriores, esta estimación se hizo de forma retrospectiva mediante una fórmula muy poco precisa (Ivarsson et al., 2000). Aun así, basándonos en estos cálculos (gramos de harinas), podemos

estimar que el consumo medio de gluten fue de 2,5 gramos en los años previos a la epidemia, (25 g de harina con un 12 % aproximado de proteína vegetal, $\times 0,8$), frente a 4,5 gramos de gluten aproximadamente durante los años de la epidemia (47 g de harina con un 12 % aproximado de proteína vegetal, $\times 0,8$). Si comparamos estas cantidades con nuestros resultados, vemos que en nuestra cohorte, a los 2 años de edad (edad a la que se consideraba que había habido un aumento del consumo), el consumo es muy superior a 4,5 gramos (considerado consumo alto en la epidemia) en todos los países excepto en España, que tiene una IMDG de 4,4 gramos a los 24 meses. Sin embargo, España presenta el mayor número de casos diagnosticados antes de los 2 años (41,6%) (**Tabla 6**), mientras que Hungría que presenta la mayor IMDG a los 2 años, tiene una de las incidencias de casos de EC menores de 2 años más bajas (4%), y ello siguiendo el mismo protocolo prospectivo de seguimiento en todos los sujetos del estudio. Por lo tanto, si la cantidad de gluten consumida durante los primeros años fuese un factor de riesgo en el desarrollo de EC, cabría esperar que los resultados fuesen contrarios.

El único estudio prospectivo, realizado en una cohorte similar a la nuestra con la que podemos comprar nuestros resultados, es el realizado en la cohorte sueca del estudio TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young), con el cual también encontramos discrepancias (Aronsson et al., 2016). Este estudio se

llevó a cabo en una cohorte de riesgo genético sueca, donde los autores cuantificaron el consumo de gluten de forma prospectiva con un registro dietético de 3 días. De acuerdo a sus resultados, los autores concluyen que los casos diagnosticados de EC, consumieron más cantidad de gluten en la visita previa a la seroconversión de los anticuerpos (4,9 g/día), en comparación con los controles (3,9 g/día). Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, para comparar las ingestas de gluten, los autores categorizaron el consumo de gluten en tertiles, estableciendo arbitrariamente los puntos de corte: bajo [$<3,4\text{g/d}$], medio [$3,4\text{--}5,0\text{g/d}$], y alto [$>5,0\text{g/d}$]. De este modo, asumen que aquellos que, por ejemplo, no consumen gluten (0 gramos) tendrían el mismo riesgo que los que consumen 3,4 gramos. Por lo tanto, la categorización de variables continuas es una limitación importante que da lugar a la pérdida de información, entre otros sesgos bien establecidos (Royston, Altman, & Sauerbrei, 2006; Naggara et al., 2011). Además, los puntos de corte establecidos no se pueden reproducir en otros estudios, ya que son aleatorios, y por lo tanto no permiten realizar comparaciones. Consideramos que nuestro estudio utiliza una metodología más adecuada para los fines perseguidos, obteniendo resultados más precisos y reproducibles y que permiten establecer el verdadero impacto del consumo de gluten en el desarrollo de EC.

Otro de los hallazgos más intrigantes de este estudio, es la interacción encontrada entre el aumento brusco de la de gluten de los 11 a 18 meses y el aumento significativo del riesgo de desarrollo de EC, en sujetos HLA-DQ2.2/DQ7 (HLA grupo 2), pero no entre otros grupos de riesgo HLA. Estos resultados sugieren que un aumento moderado del consumo de gluten hasta los 18 meses, podría modular el riesgo de EC en este genotipo específico. Estudios recientes, han demostrado que el grupo de riesgo HLA 1 (DQ2.5 / DQ2.5 y DQ2.5 / DQ2.2), tiene un riesgo intrínseco mayor de desarrollo de EC a edades tempranas, en comparación con otros grupos, incluso se ha establecido un gradiente de riesgo de EC (Lionetti et al., 2014; Liu et al., 2014; Vriezinga et al., 2014). De modo que, es posible que para el genotipo de más riesgo (grupo HLA 1), los factores ambientales, como la ingesta de gluten, no tengan ningún efecto, mientras en individuos con menos riesgo genético (como HLA-DQ2.2/DQ7), el efecto modulador de los factores ambientales como la ingesta de gluten sea más relevante. En cualquiera de los casos, nuestro estudio demuestra por primera vez que existe una relación significativa entre la ingesta de gluten, ciertos genotipos HLA y el riesgo de desarrollo de EC.

Finalmente, referente a las limitaciones del presente estudio, la principal y destacable es que, por protocolo, los sujetos recibieron unas pautas de introducción de gluten entre los 4 y 6 meses, así

como un aumento del consumo entre los 6 y 10 meses, muy específicas, que no se corresponden con la práctica habitual. Sin embargo, ya se ha demostrado que ni la edad de introducción, precoz o tardía, ni la cantidad de gluten consumida durante los primeros 3 años, son factores determinantes en el desarrollo de la EC, por lo que podemos considerar que la intervención realizada en estos sujetos no interfiere significativamente en la historia natural de la EC (Lionetti et al., 2014; Vriezinga et al., 2014). Además, el método estadístico aplicado, tiene en cuenta estos posibles sesgos potenciales. Eso, junto con las fortalezas del estudio, como son el carácter prospectivo del estudio, el tamaño muestral, el elevado número de registros evaluados de manera centralizada, y la distribución geográfica de la muestra, hacen que los resultados sean extrapolables a la población de riesgo Europea.

Estos resultados han sido publicados (Crespo-Escobar et al., 2017).

3. Tipo de trigo consumido y riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.

Además de la cantidad de gluten, otro de los factores ambientales que se analizó, fue el tipo de trigo consumido durante los primeros años en la misma cohorte, ya que, como se ha explicado en la introducción es otro de los factores que se ha sugerido como posible responsable del aumento de la incidencia de EC.

3.1 Características de la muestra

Para este análisis, se incluyeron los mismos sujetos que para el análisis anterior excepto los individuos de Alemania, puesto que no tenían la información del tipo de trigo utilizado en la elaboración de cada producto con gluten consumido. De modo que los sujetos de este análisis, también pertenecían a la cohorte del Proyecto Europeo PreventCD, y de los 944 sujetos de la cohorte total, se seleccionaron los sujetos de España, Hungría, Italia y Países Bajos, siendo el total de 637. Las características generales de la población incluida se muestran en la **Tabla 6** (exceptuando Alemania).

3.2 Patrón de consumo de productos con gluten de la cohorte total.

Partiendo de la IMDG calculada de cada individuo, se hizo un estudio descriptivo, analizando la contribución de cada uno de los productos con gluten consumido a esta ingesta total. Como se ha descrito en el método, los productos se agruparon en: pan, galletas, bollería, pasta, cereales infantiles y “otros” (productos rebozados, potitos, etc).

Las principales diferencias se encontraron en el consumo de cereales infantiles, pan, pasta y galletas, tal y como se muestra en la **Figura 17 y 18**. Los resultados en g/día y por mes, así como la contribución en porcentaje de cada producto a la IMDG en cada país, se muestran en los **Anexos IV y V**.

Cereales infantiles

El consumo más alto de cereales infantiles se registró en España en los primeros meses (1-1,5g), con un descenso significativo a partir de los 24 meses. En Hungría y Países Bajos, el consumo durante los primeros meses también fue más alto, aunque menos que en España, pero se empiezan a dejar de consumir antes que en España, a partir de los 14 meses. Por el contrario, en Italia, el consumo de cereales infantiles es insignificante a cualquier edad.

Pan

El consumo más alto de pan a cualquier edad, se registró en Hungría y Países Bajos. Entre los 14 y 36 meses, consumían entre 5-6 gramos, lo que supone 4 veces más que en España e Italia, que consumían entre 1 y 2 gramos de pan. En este caso, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de pan entre los 2 primeros países y los 2 últimos ($p < 0,001$).

Pasta

El consumo de pasta más alto se registró en Italia, que representa el 50% de la IMDG a cualquier edad, variando en 2 y 4 gramos. A los 11 y 12 meses, el consumo de pasta en Italia proviene de la “pastina”, una pasta de pequeño tamaño, considerada apta para bebés. Por el contrario, el consumo de pasta en el resto de países representa como mucho el 20% de la IMDG, variando la cantidad de consumo entre 0,5-1 gramo.

Galletas

El consumo más alto de galletas se registró en Italia, a cualquier edad, en torno a 1 y 2 gramos, seguido de Hungría, con un consumo máximo de 1,9 gramos a los 18 meses. En España y Países Bajos, la cantidad más alta encontrada estuvo en torno a 0,5 gramos.

Bollería y “otros”

La contribución de la bollería a la IMDGI fue insignificante en España y Países Bajos a cualquier edad, mientras que en Italia y Hungría, el consumo en los últimos meses fue más relevante, alrededor de 2 gramos.

Por último, en general, la contribución de otro tipo de productos con gluten a la IMDG fue despreciable en comparación con el resto de productos, a cualquier edad y en cualquier país.

3.3 Patrón de consumo de productos con gluten de los casos diagnosticados de enfermedad celiaca y los no diagnosticados.

También se hizo un análisis comparativo de las diferencias en los productos con gluten consumidos, entre casos de diagnosticados de EC y no-EC en cada país, y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, ni por edades ni por país ($p > 0,05$).

Los resultados de este análisis se muestran en el **Anexo VI**.

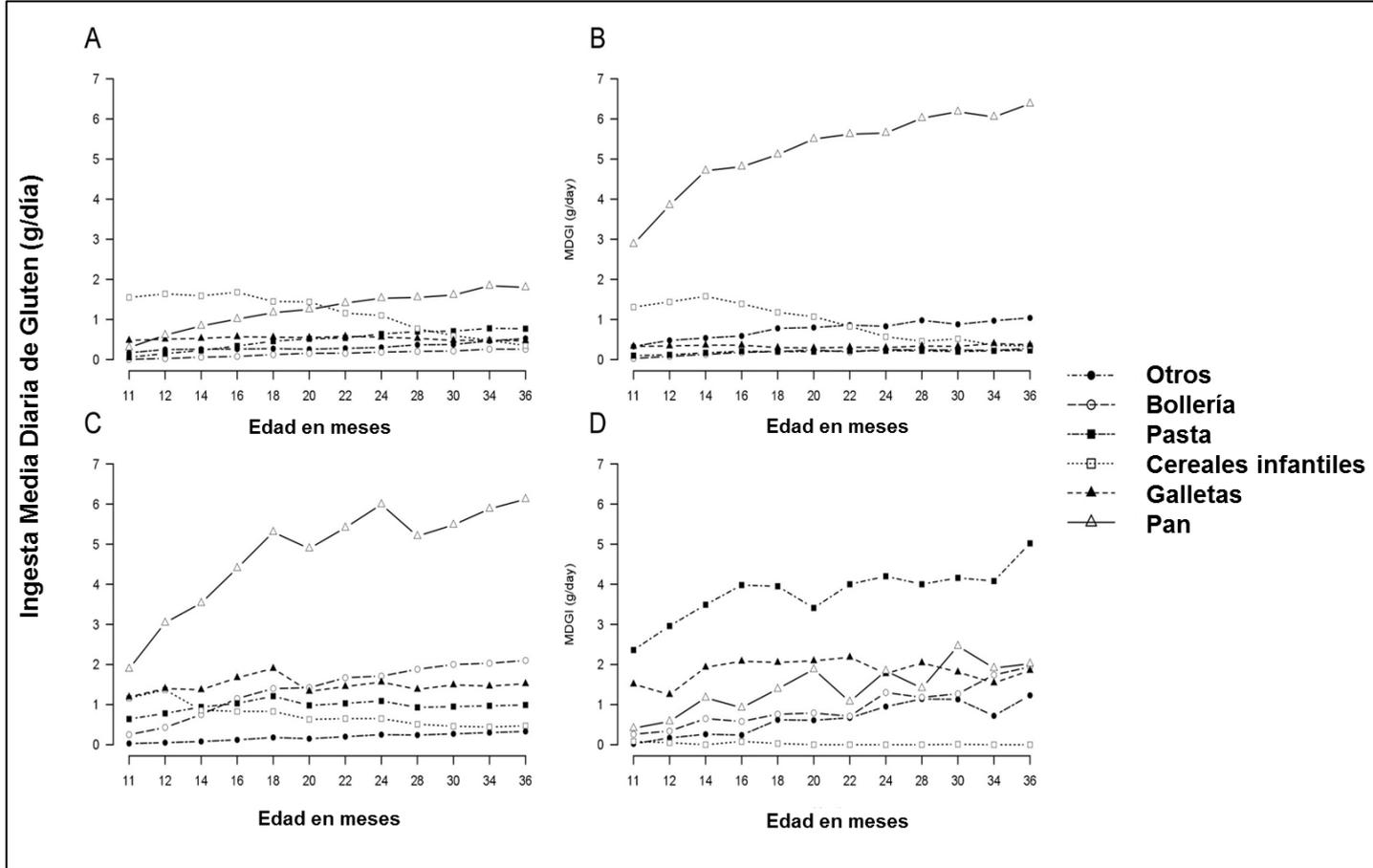


Figura 17. Consumo total de los diferentes tipos de productos sin gluten en gramos/día, por país y mes. A: España; B: Países Bajos; C: Hungría y D: Italia.

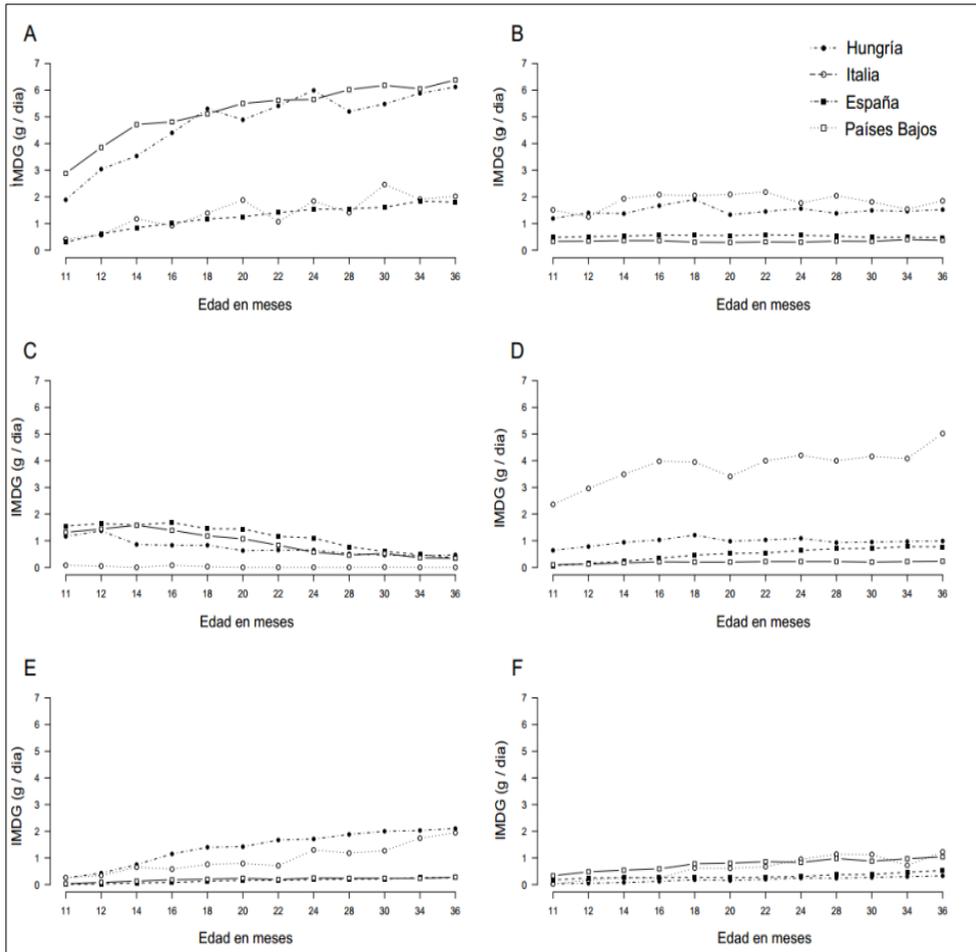


Figura 18. Cantidad de gluten consumida procedente de los diferentes productos, en cada país por mes. A: Pan; B: Galletas; C: Cereales infantiles; D: Pasta; E: Bollería; F: Otros. IMDGI: Ingesta Media Diaria de Gluten.

3.4 Tipo de trigo consumido

Además de la comparación de los productos con gluten consumidos, se hizo un análisis descriptivo del tipo de trigo consumido en cada país.

Como se ha explicado en la metodología, se analizaron de cada producto el tipo de trigo usado para su elaboración. Tras este análisis, se comprobó que en España, Italia y Países Bajos, se utilizaba la variedad *Triticum aestivum* (especie hexaploide) para la elaboración de todos los productos hechos a base de harina (pan, cereales, galletas, bollería, rebozados, etc), y el *Triticum durum* (especie tetraploide) para la elaboración de pasta. Sin embargo, en Hungría todos los productos con gluten se hacen a base de *Triticum aestivum*, sin utilizar la variedad *Triticum durum* ni para la elaboración de la pasta.

De modo que, para realizar el análisis, en España, Italia y Países Bajos, se consideró que el consumo de pan, galletas, cereales infantiles, bollería y otros representaba el consumo total de *Triticum aestivum*, mientras que el consumo de pasta representaba el de *Triticum durum*. Para Hungría, la IMDG total, se consideró como consumo de *Triticum aestivum*. Al igual que con la IMDG total, en el caso del tipo de gluten, también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre países ($p < 0,001$). El consumo

más alto de *Triticum aestivum*, se observó en Hungría a cualquier edad, seguido de Países Bajos, Italia, y por último España, con el consumo más bajo. En cuanto al *Triticum durum*, el consumo más alto se observó en Italia, a cualquier edad, coincidiendo con el consumo más alto de pasta observado en el análisis anterior. Después de Italia, el consumo más alto de *Triticum durum* se registró en España, seguido de Países Bajos y por último Hungría, cuyo consumo de *Triticum durum* era 0 (**Figura 19**).

Además de analizarse la cantidad del tipo de trigo consumido, también se analizó el patrón de consumo, es decir de qué manera aumenta el consumo de ambos tipos de trigo. Como se puede observar en la **Figura 19**, el patrón de consumo de ambos tipos de trigo, sigue la misma tendencia que la IMDG global: hay un aumento del consumo de ambos tipos más pronunciado hasta los 18 meses, un cambio de pendiente a esta edad, y un aumento más moderado del consumo desde los 18 hasta los 36 meses, excepto en el caso del *Triticum durum* en Hungría, que el consumo es 0.

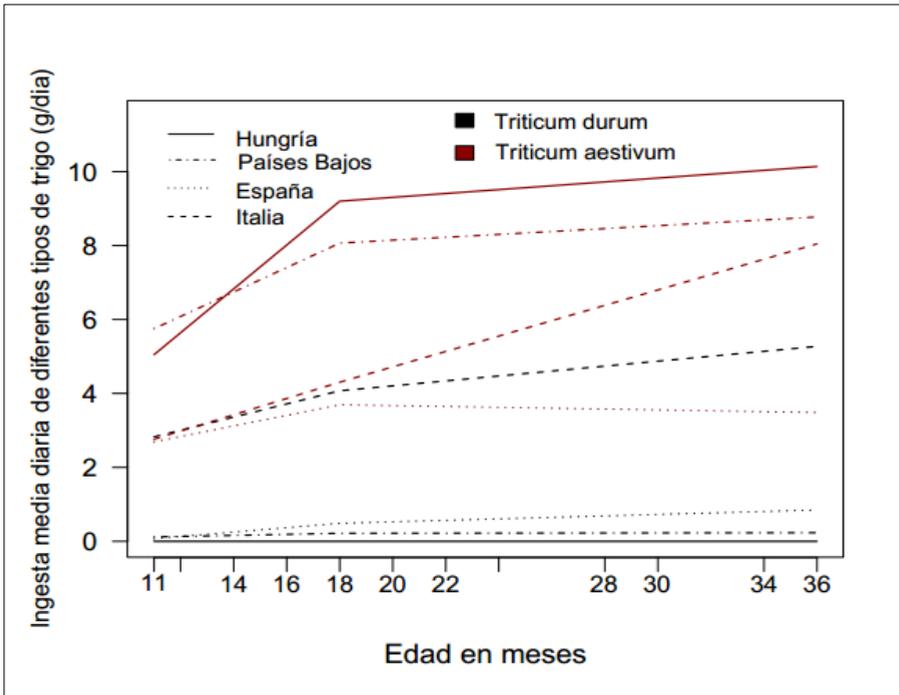


Figura 19. Consumo total de los diferentes tipos trigo (*Triticum aestivum* y *Triticum durum*), por mes y por país.

3.4.1 Grupo de intervención y género

Se hizo un análisis comparativo de la cantidad de los diferentes tipos de trigo entre los dos grupos de intervención (gluten y placebo), y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ni entre individuos del mismo país, ni en el análisis global ($p > 0,05$).

En la comparación entre género, tampoco hubieron diferencias estadísticamente significativas en el tipo de trigo consumido entre niños y niñas, ni del mismo país ni en el análisis global ($p > 0,05$).

3.5 Tipo de trigo consumido y riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca.

Del mismo modo que en el análisis anterior, para analizar el impacto de las diferentes variables en el desarrollo de la EC, se ajustó un modelo de regresión lineal de Cox, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 12**. En este caso, se analizaron las mismas variables que en el análisis anterior, excepto la cantidad de gluten como variable, sin embargo la cantidad estaba contenida en la variable cantidad de tipo de gluten, ya que esta variable se definió a partir de las IMDG de cada individuo.

Para analizar el impacto del tipo de gluten consumido, el modelo tomó como referencia el tipo que, supuestamente, tenía más riesgo, la especie hexaploide *Triticum aestivum*. Además, para mantener la coherencia con el análisis anterior, y puesto que el patrón de consumo del tipo de gluten, seguía la misma tendencia que el consumo total de gluten, en este análisis también se incluyeron las variables del patrón: pendiente inicial (aumento del consumo de *Triticum aestivum* de 11 a 18 meses), consumo de *Triticum aestivum* a los 18 meses, y pendiente final (consumo de *Triticum aestivum* de 18 a 36 meses).

También, además de los ratios de riesgos de las variables independientes, se analizó la interacción del consumo de *Triticum*

aestivum y el grupo de riesgo HLA, para comprobar si se daba la misma asociación que en el análisis anterior.

Tabla 12. Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC, incluyendo el tipo de trigo consumido (tomando *Triticum aestivum* como referencia).

Variable	HR (IC 95%) [†]	p-valor [#]
País		
Hungría	1.0 (Referencia)	--
España	0.39 (0.16, 0.95)	0.05
Italia	0.63 (0.27, 1.48)	0.29
Países Bajos	0.66 (0.32, 1.36)	0.26
Género		
Femenino	1.0 (Referencia)	--
Masculino	0.59 (0.35, 0.98)	0.05

Tabla 12 (continuación). Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC, incluyendo el tipo de trigo consumido (tomando *Triticum aestivum* como referencia).

Variable	HR (IC 95%) [†]	p-valor [#]
Grupo HLA de riesgo		
Grupo 1	1.0 (Referencia)	--
Grupo 2	0.51 (0.17, 1.52)	0.22
Grupo 3	0.32 (0.15, 0.69)	0.03*
Grupo 4	0.73 (0.15, 3.63)	0.71
Grupo 5	0.16 (0.05, 0.53)	0.02*
Patrón de consumo de <i>Triticum aestivum</i>		
Pendiente inicial	1.41 (0.48, 4.16)	0.52
IMDG estimada a los 18 m	0.96 (0.85, 1.09)	0.57
Pendiente final	0.37 (0.11, 1.17)	0.09
Interacción de las variables		
Pendiente inicial : grupo HLA 1	1.0 (Referencia)	--
Pendiente inicial : grupo HLA 2	1.69 (0.26, 10.96)	0.58
Pendiente inicial : grupo HLA 3	0.77 (0.21, 2.43)	0.59
Pendiente inicial : grupo HLA 4	0.09 (0.01, 6.52)	0.27
Pendiente inicial : grupo HLA 5	0.94 (0.18, 4.89)	0.94

HR: Ratio de Riesgo; IC: Intervalo de confianza; †: Ratio de Riesgo de cada variable asociado al riesgo de desarrollo de EC. # Los p valores para los modelos mixtos se estimaron utilizando la aproximación de Satterthwaite.

* p valores considerados estadísticamente significativos.

En este análisis se obtuvieron los ratios de riesgo (HR) para cada variable incluida en el modelo. Ninguna de las variables mostró una asociación significativa con el riesgo de desarrollo de EC, excepto los grupos HLA 3 y 5, que mostraron un riesgo menor, estadísticamente significativo, respecto al HLA 1 (p valores = 0,03, y 0,02 respectivamente).

En cuanto a la interacción entre el patrón de tipo de trigo consumido y el grupo de riesgo HLA, en este caso no se obtuvo ninguna asociación significativa, lo que significa que, en este caso, el tipo de gluten consumido no tiene un efecto significativo en el riesgo de desarrollar EC, independientemente del genotipo HLA.

3.6 Discusión

El principal hallazgo de este estudio, es que el consumo de variedades modernas de trigo, *Triticum aestivum*, entre los 11 y 36 meses de edad, no es un factor de riesgo en el desarrollo de EC hasta los 6 años de edad, en una cohorte de riesgo Europea. Aunque hubo diferencias significativas en el tipo de trigo consumido entre países, el análisis de riesgo demostró que esta variable no presenta una asociación significativa con el desarrollo de EC.

Muchos estudios realizados *in vitro*, han demostrado que las variedades hexaploides tienen más epítomos tóxicos de gluten que otras variedades de trigo, como las tetraploides (*Triticum durum*) o

especies diploides, lo que ha llevado a muchos expertos a plantearse, si quizá uno de los factores ambientales clave en el aumento de la incidencia de EC, es el tipo de trigo consumido (van Herpen et al., 2006).

En un estudio que analizó *in vitro* la inmunogenicidad de las células T frente a diferentes tipos de trigo (*Triticum urartu*, *Triticum monococcum*, *Triticum tauschii*, *Triticum dicoccoides*, *Triticum durum* y *Triticum aestivum*), los autores concluyen que la mayoría de secuencias que codifican el péptido 33-mer, están codificadas a su vez por genes localizados en el cromosoma 6D, lo que significaría que las variedades hexaploides, que son las únicas que contienen el genoma D, tendrían mayor número de este péptido, que se sabe que es uno de los de mayor toxicidad en EC (Molberg et al., 2005).

Otros estudios posteriores también realizados *in vitro*, encontraron resultados similares. Las variedades hexaploides mostraron mayor expresión de α -gliadinas (las fracciones más inmunogénicas del gluten), que las variedades de trigo tetraploides, sugiriendo la posibilidad de que estas diferencias tuvieran un impacto en el desarrollo de EC. (Salentijn et al., 2009; Zhang et al., 2011; Žilić, Barać, Pešić, Dodig, & Ignjatović-Micić, 2011). A pesar de los hallazgos, los autores sugieren que es necesario evaluar el verdadero impacto del tipo de trigo consumido en el desarrollo de EC *in vivo*.

Por otro lado, en un reciente y exhaustivo estudio en el que se analizaron: 53 variedades de *Triticum aestivum*, cultivado a gran escala, 19 variedades de *Triticum aestivum* cultivado por agricultores locales, a pequeña escala, 20 variedades de *Triticum spelta*, 15 variedades de *Triticum durum* cultivado a gran escala y 19 variedades de *Triticum durum* cultivado a pequeña escala por agricultores locales, los autores concluyen que la variación en el contenido de α -gliadinas no se correlaciona con la variación en el contenido de epítomos tóxicos, además de que dentro de una misma especie (diploide, tetraploide o hexaploide), la cantidad de epítomos tóxicos varía según las variedades. Asimismo, sus resultados también demuestran que las variedades modernas no son más tóxicas que las variedades ancestrales o locales y que las especies hexaploides dependiendo de la variedad, pueden tener más o menos epítomos tóxicos y por lo tanto, ser más o menos agresivas en la EC (Ribeiro et al., 2016).

Nuestros resultados, confirmarían *in vivo*, en una cohorte de riesgo, los resultados obtenidos por Ribeiro et al. Sin embargo, no podemos compararlos con otros estudios *in vivo*, ya que todos los ensayos realizados hasta la fecha se han realizado *in vitro*.

4. Análisis la subcohorte Española.

4.1 Características de la muestra

La cohorte española del estudio, estaba compuesta por 225 niños reclutados en hospitales terciarios de Valencia, Madrid y Reus, procedentes de distintas áreas geográficas del país. En el momento de este análisis, todos habían cumplido al menos los 6 años de edad, siendo el 60 %, mayores de 8 años; se diagnosticaron 26 casos de EC, lo que representa el 11,5% del total. En la **Tabla 13**, se muestran las características generales de la población incluida en el estudio.

Tabla 13. Características generales de la subcohorte Española.

				Grupo de HLA de riesgo (n) [†]				
Centro de investigación	n*	Grupo de intervención [#] Gluten / Placebo	Género M / F	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Madrid	63	34 / 29	39 / 24	9	6	27	5	16
Valencia	75	37 / 38	45 / 30	16	7	34	5	13
Reus	87	45 / 42	43 / 44	26	6	35	3	17
Total Cohorte	225	116 / 109	127 / 98	51 (22,6%) ^{\$}	19 (8,4%) ^{\$}	96 (42,6) ^{\$}	13 (5,7%) ^{\$}	46 (20,4%) ^{\$}
Casos de EC	26	16 / 10	18 / 8	13 (25%) ^β	2 (10%) ^β	11 (11%) ^β	0	0

*Número total de niños incluidos en cada centro y número total de casos diagnosticados de EC. #Número de niños que recibieron gluten o placebo entre las semanas 16 y 24 de la cohorte general y de los casos diagnosticados. †Genotipo HLA, Grupo 1 incluye DQ2.5/DQ2.5 y DQ2.5/DQ2.2; grupo 2 DQ2.2/DQ7; grupo 3 DQ2.5/DQ7, DQ2.5/DQ8, y DQ2.5/X; grupo 4 DQ2.2/DQ2.2, DQ2.2/DQ8 y DQ8/DQ8; y grupo 5 DQ2.2/X, DQ8/DQ7 y DQ8/X. \$Porcentaje que representa respecto a la cohorte total de 225 niños. B Porcentaje que representan los casos de EC, dentro de cada grupo de riesgo, respecto al total del grupo HLA

4.2 Factores ambientales: gluten y lactancia materna

Se analizaron un total de 2565 CFC (hasta 12 registros alimentarios por niño), cuyos resultados se muestran en la **Tabla 14** y **Figura 20**. A partir de los 10 meses, cuando se permitió un consumo libre de gluten, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres poblaciones ($p < 0,001$), encontrándose el consumo más bajo en Reus y el más alto en Valencia. Sin embargo, cuando se comparó el consumo medio de gluten entre los casos de EC y no EC (**Tabla 14**), no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,25$).

También se realizó la comparación del IMDG entre niños y niñas, que no mostró diferencias estadísticamente significativas, ni en el análisis global ($p = 0,29$), ni entre niños y niñas del mismo centro ($p = 0,18$).

Por último, se analizó la duración media de lactancia materna y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) ni entre centros, siendo la duración media de 8, 7 y 6 meses en Madrid, Reus y Valencia, respectivamente; ni entre casos de EC (duración media de 6 meses) y no EC (duración media de 5 meses).

Tabla 14. Ingesta media diaria de gluten por centro de investigación y según diagnóstico, EC versus no-EC, en el momento del estudio.

Edad (meses)	Centro de investigación			Global	
	Madrid	Valencia	Reus	EC (n=24)	No-EC (n=221)
	IMDG (SD)	IMDG (SD)	IMDG (SD)	IMDG (SD)	IMDG (SD)
11	2,98 (1,44)	2,71 (1,28)	2,13 (1,01)	2,59 (1,56)	2,55 (1,24)
12	3,62 (1,65)	3,18 (1,66)	2,78 (1,06)	3,65 (1,63)	3,09 (1,46)
14	4,00 (1,75)	3,57 (1,38)	2,98 (1,05)	3,73 (1,33)	3,43 (1,45)
16	4,23 (1,95)	4,47 (1,79)	3,15 (1,21)	4,06 (1,98)	3,86 (1,71)
18	4,24 (2,00)	4,42 (1,91)	3,53 (1,17)	4,52 (2,03)	3,96 (1,69)
20	4,28 (1,92)	4,83 (2,29)	3,61 (1,37)	4,54 (1,72)	4,17 (1,96)
22	4,28 (1,95)	4,48 (2,20)	3,79 (1,74)	4,70 (1,82)	4,11 (1,99)
24	4,39 (1,95)	5,01 (2,14)	3,82 (1,33)	5,23 (2,85)	4,31 (1,76)
28	3,87 (1,73)	5,31 (1,80)	3,41 (1,43)	4,78 (2,03)	4,18 (1,83)
30	3,99 (1,41)	5,05 (1,99)	3,38 (1,35)	5,60 (2,35)	4,11 (1,74)
34	4,25 (1,28)	5,49 (2,18)	3,60 (1,53)	5,96 (2,22)	4,42 (1,90)
36	4,50 (1,37)	5,30 (2,11)	3,44 (1,36)	5,82 (3,38)	4,53 (1,77)

IMDG: Ingesta Media Diaria de Gluten en gramos/día, SD: Desviación Estándar, EC: casos diagnosticados de enfermedad celiaca, No-EC: casos sanos.

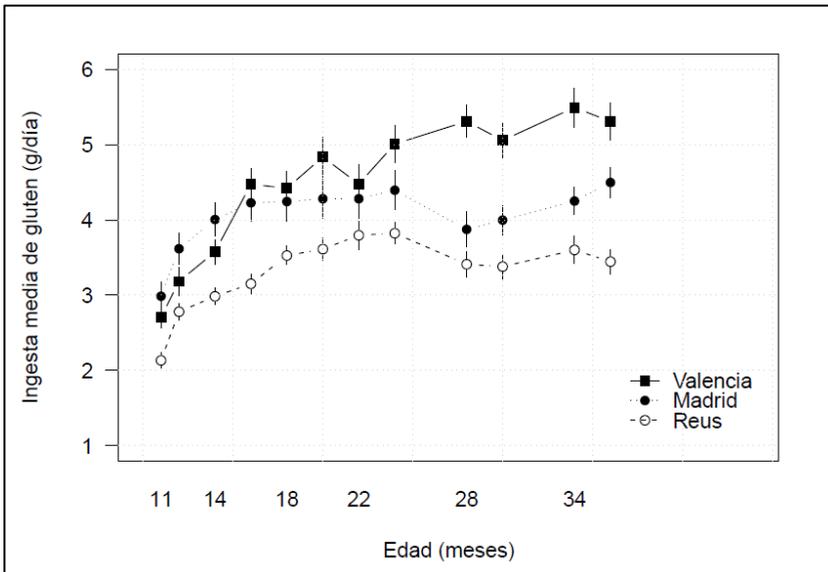


Figura 20. Ingesta media diaria de gluten (g/día) en los diferentes centros de investigación españoles.

4.3 Riesgo de desarrollo de enfermedad celiaca

Además del estudio descriptivo, mediante el método de regresión de Cox, se analizó el riesgo de desarrollo de EC, ajustado para todas las variables de riesgo. Como se muestra en la **Tabla 15**, los resultados más destacables se obtuvieron en el HLA y el género.

De los 5 grupos de riesgo genético establecidos, los HLA homocigotos (grupo 1: DQ2.5/DQ2.5 y DQ2.5/DQ2.2) presentaron un riesgo relativo 4 veces superior, con un valor de 4,7 [95% IC (0,80-27,55)] y un p-valor próximo a la significación estadística ($p=0,08$). Como puede observarse en la Tabla 14 anterior, 13 de los 26 casos de EC, pertenecían al grupo 1, lo que supone el 50% del total. Por

otro lado, el género masculino presentó un riesgo relativo 5 veces menor, 0,18 [95% IC (0,03-1,16)], con un p-valor también cercano a la significación estadística ($p=0,07$).

El aumento progresivo del consumo de gluten, presentó un riesgo relativo de 1,11 [95% IC (0,69-1,78)], sin significación estadística ($p=0,66$). El resto de variables estudiadas (ciudad y grupo de intervención) tampoco presentaron asociación significativa con el desarrollo de EC.

Tabla 15. Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC de la subcohorte española.

Variable	HR (IC 95%) [†]	p-valor [#]
Ciudad		
Madrid	1,0 (Referencia)	--
Reus	0,9 (0,17 - 4,55)	0,90
Valencia	0,1 (0,04 - 3,01)	0,20
Género		
Femenino	1,0 (Referencia)	--
Masculino	0,2 (0,02 - 1,16)	0,07

Tabla 15 (continuación). Efecto de cada una de las variables incluidas en el modelo multivariable de regresión de Cox, en el riesgo de desarrollo de EC de la subcohorte española.

Variable	HR (IC 95%) [†]	p-valor [#]
Grupo de riesgo HLA		
Grupo 1	4,7 (0,80 – 27,5)	0,08
Grupo 2	3,2 (0,21 – 22,0)	0,32
Grupo 3	1,0 (Referencia)	---
Grupo 4	1,7 (0,05 – 53,4)	0,75
Grupo 5	0,4 (0,01 – 14,0)	0,64
Consumo de gluten	1,1 (0,69 - 1,78)	0,66

HR: Ratio de Riesgo; IC: Intervalo de confianza; †: Ratio de Riesgo de cada variable asociado al riesgo de desarrollo de EC. # Los p valores para los modelos mixtos se estimaron utilizando la aproximación de Satterthwaite.

* p valores considerados estadísticamente significativos.

4.4 Características de los casos diagnosticados de enfermedad celiaca

Los 26 casos fueron diagnosticados mediante biopsia intestinal, presentando todos un grado de lesión Marsh 3 y valores de anti-TG2 positivos previos a la biopsia, siendo la mediana de edad de aparición de la serología positiva de 24 meses [rango, 12-94] y ningún caso

presentaba déficit de IgA. Todas las características de los casos diagnosticados de EC, se muestran en el **Anexo VII**.

Características clínicas

Respecto a la clínica, 21 niños mostraron sintomatología gastrointestinal, de los cuales 16, presentaron diarrea con al menos uno o más síntomas asociados (dolor/distensión abdominal y/o vómitos). Los otros 5 casos sintomáticos, presentaron estreñimiento, algunos junto a dolor abdominal y anorexia. En ninguno de los 21 casos se observó afectación nutricional grave. De los 5 casos considerados asintomáticos, solo uno presentó ferropenia, sin anemia.

Edad de diagnóstico

En cuanto a la edad de diagnóstico, 10 niños fueron diagnosticados antes de los 24 meses (2 asintomáticos) y 9 casos entre los 25-36 meses, es decir, el 73% debutaron antes de los 3 años de edad. Los 7 casos restantes tenían más de 3 años al debut (3 sujetos asintomáticos), siendo la mediana de edad de diagnóstico de los casos (momento en el que se realiza la biopsia) de 26 meses [rango, 14-96].

Género y grupo de riesgo HLA

Los datos más relevantes se encontraron en la distribución por sexo y grupo HLA de riesgo. De los 26 casos, 13 pertenecían al grupo 1 (homocigotos), de los cuales 11 debutaron antes de los 3 años de edad y los otros dos entre los 3 y 4 años. Del grupo de riesgo 3, se diagnosticaron 11 casos, de los cuales 7 antes de los 3 años, y el resto entre 4 y 8 años. Finalmente, los 2 casos restantes pertenecían al grupo de riesgo 2, debutando uno a los 27 meses y otro a los 4 años de edad. Del grupo de riesgo 4 y 5 no se diagnosticó ningún caso. Teniendo en cuenta la distribución de grupos de riesgo de la cohorte total (**Tabla 13**), esto supone que de los 51 sujetos homocigotos, el 25%, desarrolló la enfermedad, mientras que de los 96 sujetos del grupo de riesgo 3, solo lo hizo el 11% y, en el caso del grupo de riesgo 2, solo el 10% de los sujetos.

Por último, en cuanto al género, de los 26 casos diagnosticados, 18 fueron niñas (70%), y se diagnosticaron todas antes de los 4 años, excepto 1 que debutó a los 8 años. Por otro lado, 10/18 pertenecían al grupo de riesgo 1, 1 niña al grupo 2 y 7 niñas al grupo de riesgo 3. Finalmente, durante el periodo de intervención (entre los 4 y 6 meses) 14 habían recibido gluten y 4 placebo. De los 8 niños que desarrollaron la enfermedad, 3 pertenecían al grupo de riesgo 1, solo 1 al grupo 2 y 4 niños al grupo 3 de riesgo. 5/8 debutaron entre los 2 y

2 años y medio, y los otros a los 4, 5 y 7 años. Finalmente, 6/8 habían recibido placebo durante el periodo de intervención y 2 niños gluten.

Lo más destacable es que de la cohorte total (225 niños), 51 eran homocigotos, 24 niñas y 27 niños. De los 27 niños, solo 3 desarrollaron EC (11%), mientras que de las 24 niñas, se diagnosticaron 10 casos, lo que supone el 40% de las niñas homocigotas, debutando todas antes de los 4 años.

4.5 Discusión

El seguimiento desde el nacimiento hasta el diagnóstico de EC de esta subcohorte, pone de manifiesto que, en población de riesgo genético, la enfermedad puede debutar muy precozmente, especialmente en los sujetos DQ2 homocigotos (HLA-DQ2.5/DQ2.5 y DQ2.5/DQ2.2), ya que de los 13 casos, todos debutaron antes de los 4 años de edad. Además, este grupo genético, con 4 veces más riesgo de EC, representa el 50% de los casos diagnosticados pero sólo representa el 22% de los casos de la cohorte total. Sin embargo, tampoco hay que obviar que de los 13 casos restantes, que pertenecían a los grupos de riesgo 2 y 3, 8 sujetos debutaron antes de los 3 años. Estos resultados son similares a otras cohortes europeas y americanas que demostraban que el genotipo es uno de los factores clave de la enfermedad y que el mayor riesgo de

desarrollo de EC en sujetos homocigotos ya se manifiesta desde edades muy tempranas (Pietzak, Schofield, McGinniss, & Nakamura, 2009; Lionetti et al., 2014; Liu et al., 2014; Vriezinga et al., 2014). También, en los análisis previos de esta tesis, se ha visto la importancia del HLA en el desarrollo de la EC (Vriezinga et al., 2014).

Si comparamos la prevalencia global de casos de EC en nuestra cohorte, con otras series españolas, que estudian familiares de primer grado, aunque están en consonancia, la nuestra es más elevada, 11,6% frente al 7% estimado (Castaño et al., 2004; Vaquero et al., 2014; Vitoria, Arrieta, Astigarraga, Garcia-Masdevall, & Rodriguez-Soriano, 1994). Considerando que ninguna estas series estudiadas anteriormente incluye población pediátrica, ni especifican la distribución de grupos de riesgo HLA, nuestro estudio sugiere por un lado que, o bien nosotros ya hemos diagnosticado la mayoría de casos de EC que corresponden a nuestra cohorte, a pesar de que el seguimiento se ha realizado hasta los 6-8 años de edad, o bien que en otros estudios el número de casos debutando de forma oligo o asintomática en edad pediátrica quedan sin identificar y por lo tanto, la prevalencia global en estas series esta subestimada. Y por otro, puede ser que en nuestra cohorte el porcentaje de sujetos HLA homocigotos sea mayor que en otras series españolas estudiadas, y por lo tanto nuestra mayor prevalencia se deba a este factor.

Nuestros resultados también confirman que los niños presentan un riesgo de desarrollo de EC 5 veces inferior respecto a las niñas, datos que concuerdan con otros estudios, que ponen de manifiesto que las niñas tienen mayor riesgo de desarrollo de EC desde edades precoces (Ivarsson, Persson, Nyström, & Hernell, 2003; Mearin, 2007; Markle & Fish, 2014; Vriezinga et al., 2014). Pero además, hay que destacar que del total de la cohorte, el 40% de las niñas homocigotas fueron diagnosticadas de EC, y todas, excepto una, antes de los 4 años de edad. Esto indica que no solo hay que considerar el genotipo como factor clave, sino que la combinación del genotipo homocigoto con el sexo femenino, puede dar lugar a un debut muy precoz de la enfermedad y por lo tanto hay que tenerlo en cuenta para el seguimiento de población de riesgo desde edades muy tempranas. Estos hallazgos confirman los resultados obtenidos en el estudio PreventCD en el que se observaba como la combinación de ambos factores aumenta el riesgo de desarrollo de EC hasta los 3 años. Sin embargo, en nuestra cohorte hemos comprobado que este efecto se mantiene hasta los 6 años, edad hasta la que se ha seguido la cohorte.

En cuanto a las formas clínicas de manifestación de la enfermedad, en nuestra cohorte hemos comprobado que, aunque la mayoría presentaron síntomas gastrointestinales característicos de la enfermedad, 5 estaban asintomáticos en el momento del diagnóstico.

Esto demuestra que la EC paucisintomática no es exclusiva del niño mayor o del adolescente, como se ha considerado clásicamente (Rodrigo Sáez et al., 2011; Cilleruelo et al., 2014). Por otra parte, todos los sujetos diagnosticados presentaron anticuerpos positivos, incluso los 6 que debutaron antes de los 2 años de edad, que positivizaron entre 12 y 18 meses. Aunque el número de casos es pequeño, llama la atención la discrepancia con publicaciones previas, que refieren un 17% de anti-TG2 negativos en niños menores de 18 meses (Lagerqvist et al., 2008); pero coinciden con los resultados de otras cohortes europeas donde todos los casos, independientemente de la edad, presentaban anti-TG2 positivos al diagnóstico (Lionetti et al., 2014; Vriezinga et al., 2014).

Respecto a los resultados obtenidos sobre el impacto de la cantidad de gluten consumida en el desarrollo de EC, considerando que el intervalo de confianza de la variable consumo de gluten, es de [0,69-1,78], el aumento progresivo de la ingesta de gluten entre los 11 y 36 meses, podría reducir o aumentar el riesgo de desarrollo de EC, pero en ningún caso, sería significativo. Además, el consumo de los casos de EC y no-EC, fue similar. Los datos concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis anterior, y estos resultados, del impacto de la cantidad de gluten y el riesgo de desarrollo de EC, ya se han discutido también en el apartado anterior.

Finalmente, puesto que los sujetos de la cohorte Española, pertenecen a la cohorte general del PreventCD, las limitaciones y fortalezas de este subanálisis son las mismas descritas en apartados anteriores, aunque hay que destacar que una limitación añadida a este análisis es que el número de sujetos era menor que el de la cohorte total del estudio principal.

V. CONCLUSIONES

1. Conclusiones

Partiendo de las hipótesis planteadas, y en base a los resultados obtenidos, podemos concluir que:

1. Los CFC desarrollados y validados, son unas herramientas fiables y precisas para evaluar el consumo de gluten en España en niños de 7 a 36 meses de edad, tanto con fines clínico-asistenciales, como para realizar estudios epidemiológicos.
2. La cantidad de gluten consumida durante los 3 primeros años de vida, no es un factor de riesgo asociado al desarrollo de enfermedad celiaca hasta los 6 años, para la mayoría de genotipos HLA.
3. El aumento brusco del consumo de gluten entre los 11 y 18 meses, podría aumentar el riesgo de desarrollo de EC en sujetos HLA-DQ2.2/DQ7.
4. El patrón de consumo de gluten en población pediátrica, es similar en Europa y se cumple en todos los países estudiados: un aumento brusco del consumo entre los 11 y 18 meses, y un aumento más moderado a partir de los 18 meses.
5. España es el país con menor consumo de gluten a cualquier edad, seguido de Alemania, Países Bajos, Hungría e Italia, siendo estos dos últimos los de mayor consumo.
6. El tipo de trigo (harina) consumido durante los 3 primeros años de vida, tampoco es un factor de riesgo asociado al desarrollo de la

EC hasta los 6 años: ni el consumo de trigo hexaploide aumenta el riesgo de desarrollo de EC, ni el consumo de trigo tetraploide tuvo un efecto (protector) significativo en el desarrollo de EC.

7. El consumo de ambos tipos de trigo, sigue un patrón similar al del consumo total de gluten: un aumento brusco del consumo entre los 11 y 18 meses, y un aumento más moderado a partir de los 18 meses.
8. La tendencia del consumo de alimentos con gluten en población pediátrica, es similar en Europa: el consumo de cereales infantiles disminuye con la edad, mientras que el consumo de pan, pasta, galletas y bollería aumenta con la edad.
9. En el análisis de la subcohorte Española se confirman los resultados obtenidos previamente en la cohorte del PreventCD: el genotipo HLA junto con el género, son los factores más determinantes en el desarrollo de la enfermedad hasta los 6 años de edad.
10. En general, los sujetos homocitogos (HLA-DQ2.5/DQ2.2 y HLA-DQ2.5/DQ2.2), presentaron hasta 4 veces más riesgo que los sujetos con otros genotipos HLA. Por otro lado, en el género femenino se duplica el riesgo.
11. Finalmente, este análisis de la subcohorte Española, también mostró que la combinación de ambos factores (HLA homocigoto y género femenino) todavía aumentaba más el riesgo de desarrollo

de la EC y este efecto se mantienen al menos hasta los 6 años de edad.

12. Las formas asintomáticas de debut no son exclusivas del niño mayor, pudiendo encontrarse incluso en lactantes (menores de dos años).

2. Aplicaciones prácticas

Las herramientas desarrolladas (los CFC), podrán ser utilizadas tanto con fines clínicos, por ejemplo ante la sospecha de EC en edades muy tempranas para analizar si el niño está consumiendo o no gluten y en qué cantidad, como para realizar estudios epidemiológicos que requieran un conocimiento preciso del consumo de gluten en cualquier población española.

Actualmente no existe suficiente evidencia para establecer la edad más adecuada para introducir el gluten en la dieta del lactante con riesgo de EC. En base a nuestros resultados, tampoco habría suficiente evidencia para postular recomendaciones específicas en cuanto a la cantidad y forma más adecuada de introducir el gluten en la dieta del lactante con riesgo de EC. Por ello consideramos que el gluten, en sujetos de riesgo, debería introducirse como un componente más de la alimentación complementaria.

Por último, al ser el genotipo HLA junto con el género, los factores más determinantes en el desarrollo de la enfermedad, y considerando

la precocidad con la que puede debutar la misma, se justifica la realización del cribado precoz en pacientes con al menos un familiar de primer grado diagnosticado de EC. La identificación de individuos con alto riesgo permitiría un seguimiento más precoz, exhaustivo y regular, sobre todo de homocigotos DQ2, agilizando el diagnóstico de la enfermedad. Actualmente no existen recomendaciones específicas de ningún organismo, nacional o europeo, en cuanto a cómo programar el seguimiento en esta población de riesgo, pero, de acuerdo con nuestros resultados y con los de los estudios recientes ya comentados, consideramos que sería apropiado que a partir de los 18 meses y, al menos, hasta los 6 años se realizaran controles clínicos y serológicos anuales. Se conseguiría de este modo evitar las graves consecuencias de un diagnóstico tardío, así como reducir el coste sanitario, evitando pruebas complementarias innecesarias.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Agostoni, C., Decsi, T., Fewtrell, M., Goulet, O., Kolacek, S., Koletzko, B., et al. (2008). Complementary feeding: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 46(1), 99-110.

Akobeng, A. K., Ramanan, A. V., Buchan, I., & Heller, R. F. (2006). Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Disease in Childhood*, 91(1), 39-43.

Anderson, C. M., & Brueton, M. J. (1985). Does breast feeding protect against the development of clinical symptoms of celiac disease in children?. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 4(3), 507.

Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, Ø., Scott, H., Koning, F., Jung, G., et al. (2004a). The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*, 1(1), e1.

Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, Ø., Scott, H., Koning, F., Jung, G., et al. (2004b). The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*, 1(1), e1.

- Aronsson, C. A., Lee, H., Koletzko, S., Uusitalo, U., Yang, J., Virtanen, S. M., et al. (2016). Effects of gluten intake on risk of celiac disease: A case-control study on a Swedish birth cohort. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(3), 403-409. e3.
- Ascher, H., Krantz, I., Rydberg, L., Nordin, P., & Kristiansson, B. (1997). Influence of infant feeding and gluten intake on coeliac disease. *Archives of Disease in Childhood*, 76(2), 113-117.
- Barkin, J. (2006). Physician awareness of celiac disease: A need for further education zipser RD, farid M, baisch D, et al (harbor-UCLA med ctr, torrance, calif; west los angeles VA hosp; celiac disease found, studio city, calif) *J gen intern med* 20: 644–646, 2005. *Year Book of Medicine, 2006*, 398-400.
- Belton, P. (2005). New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 41(2), 203-211.
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*, 8(2), 135-160.

- Bourgey, M., Calcagno, G., Tinto, N., Gennarelli, D., Margaritte-Jeannin, P., Greco, L., et al. (2007). HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*, 56(8), 1054-1059.
- Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J. J., Stencel-Baerenwald, J. E., Ikizler, M., Mayassi, T., et al. (2017). Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science*, 356(6333), 44-50.
- Bravo, F. (2011). Adherencia e impacto de la dieta sin gluten en niños con enfermedad celíaca. *Revista Chilena De Pediatría*, 82(3), 191-197.
- Bustamante, M. Á., Fernández-Gil, M. P., Churruca, I., Miranda, J., Lasa, A., Navarro, V., et al. (2017). Evolution of gluten content in cereal-based gluten-free products: An overview from 1998 to 2016. *Nutrients*, 9(1), 21.
- Cade, J., Thompson, R., Burley, V., & Warm, D. (2002). Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires—a review. *Public Health Nutrition*, 5(04), 567-587.
- Capilla, A., Donat, E., Planelles, D., Espinós, C., Ribes-Koninckx, C., & Palau, F. (2007). Genetic analyses of celiac disease in a

spanish population confirm association with CELIAC3 but not with CELIAC4. *Tissue Antigens*, 70(4), 324-329.

Cardones, A. R. G., & Hall, R. P. (2012). Pathophysiology of dermatitis herpetiformis: A model for cutaneous manifestations of gastrointestinal inflammation. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 32(2), 263-274.

Castaño, L., Blarduni, E., Ortiz, L., Núñez, J., Bilbao, J. R., Rica, I., et al. (2004). Prospective population screening for celiac disease: High prevalence in the first 3 years of life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39(1), 80-84.

Catassi, C., Kryszak, D., Bhatti, B., Sturgeon, C., Helzlsouer, K., Clipp, S. L., et al. (2010). Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Annals of Medicine*, 42(7), 530-538.

Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., et al. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 160-166.

- Catassi, C., Gatti, S., & Fasano, A. (2014). The new epidemiology of celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59 Suppl 1, S7-9.
- Catassi, C., Gatti, S., & Lionetti, E. (2015). World perspective and celiac disease epidemiology. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 33(2), 141-146.
- Cenit, M. C., Olivares, M., Codoñer-Franch, P., & Sanz, Y. (2015). Intestinal microbiota and celiac disease: Cause, consequence or co-evolution? *Nutrients*, 7(8), 6900-6923.
- Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., et al. (2005). Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (triticum and aegilops). *The Plant Cell*, 17(4), 1033-1045.
- Cilleruelo, M. L., Roman-Riechmann, E., Sanchez-Valverde, F., Donat, E., Manuel-Ramos, J., Martin-Orte, E., et al. (2014). Spanish national registry of celiac disease: Incidence and clinical presentation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59(4), 522-526.
- Collado, M. C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2009). Specific duodenal and faecal bacterial groups

associated with paediatric coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology*, 62(3), 264-269.

Collin, P., Salmi, T. T., Hervonen, K., Kaukinen, K., & Reunala, T. (2016). Dermatitis herpetiformis: A cutaneous manifestation of coeliac disease. *Annals of Medicine*, , 1-9.

Crespo Escobar, P., Calvo Lerma, J., Hervás Marín, D., Donat Aliaga, E., Masip Simó, E., Polo Miquel, B., et al. (2015). Development and validation of two food frequency questionnaires to assess gluten intake in children up to 36 months of age. *Nutricion Hospitalaria*, 32(5)

Crespo-Escobar, P., Mearin, M. L., Hervas, D., Auricchio, R., Castillejo, G., Gyimesi, J., et al. (2017). The role of gluten consumption at an early age in celiac disease development: A further analysis of the prospective PreventCD cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(4), 890-896.

Curley, C. R., Monsuur, A. J., Wapenaar, M. C., Rioux, J. D., & Wijmenga, C. (2006). A functional candidate screen for coeliac disease genes. *European Journal of Human Genetics*, 14(11), 1215-1222.

- Dema, B., Martínez, A., Fernández-Arquero, M., Maluenda, C., Polanco, I., De la Concha, E., et al. (2009). Lack of replication of celiac disease risk variants reported in a spanish population using an independent spanish sample. *Genes and Immunity*, 10(7), 659-661.
- Dieli-Crimi, R., Cénit, M. C., & Núñez, C. (2015). The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *Journal of Autoimmunity*, 64, 26-41.
- Dubé, C., Rostom, A., Sy, R., Cranney, A., Saloojee, N., Garritty, C., et al. (2005). The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk western european populations: A systematic review. *Gastroenterology*, 128(4), S57-S67.
- Dubois, P. C., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K. A., Romanos, J., Curtotti, A., et al. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature Genetics*, 42(4), 295-302.
- Dvořák, J., Terlizzi, P. d., Zhang, H., & Resta, P. (1993). The evolution of polyploid wheats: Identification of the A genome donor species. *Genome*, 36(1), 21-31.

- Elli, L., Bergamini, C., Bardella, M., & Schuppan, D. (2009). Transglutaminases in inflammation and fibrosis of the gastrointestinal tract and the liver. *Digestive and Liver Disease*, 41(8), 541-550.
- Emilsson, L., Magnus, M. C., & Størdal, K. (2015). Perinatal risk factors for development of celiac disease in children, based on the prospective norwegian mother and child cohort study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(5), 921-927.
- Esteve, M., Rosinach, M., Fernandez-Banares, F., Farre, C., Salas, A., Alsina, M., et al. (2006). Spectrum of gluten-sensitive enteropathy in first-degree relatives of patients with coeliac disease: Clinical relevance of lymphocytic enteritis. *Gut*, 55(12), 1739-1745.
- Fälth-Magnusson, K., Franzen, L., Jansson, G., Laurin, P., & Stenhammar, L. (1996). Infant feeding history shows distinct differences between swedish celiac and reference children. *Pediatric Allergy and Immunology*, 7(1), 1-5.
- Farre, C., Esteve, M., Curcoy, A., Cabre, E., Arranz, E., Amat, L., et al. (2002). Hypertransaminasemia in pediatric celiac disease patients and its prevalence as a diagnostic clue. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(12), 3176-3181.

- Farrell, R. J., & Kelly, C. P. (2002). Celiac sprue. *New England Journal of Medicine*, 346(3), 180-188.
- Fasano, A. (2005). Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology*, 128(4), S68-S73.
- Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R. B., Drago, S., et al. (2003). Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the united states: A large multicenter study. *Archives of Internal Medicine*, 163(3), 286-292.
- Fasano, A., & Catassi, C. (2012). Celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 367(25), 2419-2426.
- Fasano, A., Not, T., Wang, W., Uzzau, S., Berti, I., Tommasini, A., et al. (2000). Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *The Lancet*, 355(9214), 1518-1519.
- Fasano, A., & Shea-Donohue, T. (2005b). Mechanisms of disease: The role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 2(9), 416-422.

Fasano, A. (2011). Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological Reviews*, 91(1), 151-175.

Fois, S., Schlichting, L., Marchylo, B., Dexter, J., Motzo, R., & Giunta, F. (2011). Environmental conditions affect semolina quality in durum wheat (*triticum turgidum* ssp. *durum* L.) cultivars with different gluten strength and gluten protein composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(14), 2664-2673.

Gee S. (1888). On the coeliac affection. *St. Bartholomew's Hospital Reports*, 24, 17-20

Gibert, A., Espadaler, M., Angel Canela, M., Sanchez, A., Vaque, C., & Rafecas, M. (2006). Consumption of gluten-free products: Should the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 p.p.m.? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18(11), 1187-1195.

Gibert, A., Kruizinga, A. G., Neuhold, S., Houben, G. F., Canela, M. A., Fasano, A., et al. (2013). Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population-based probabilistic approach to risk estimation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(1), 109-116.

Giordano, M., Marano, C., Mellai, M., Limongelli, M., Bolognesi, E., Clerget-Darpoux, F., et al. (2006). A family-based study does not confirm the association of MYO9B with celiac disease in the Italian population. *Genes and Immunity*, 7(7), 606-608.

Gokce, S., & Arslantas, E. (2015). Changing face and clinical features of celiac disease in children. *Pediatrics International*, 57(1), 107-112.

Greco, L., Babron, M., Corazza, G., Percopo, S., Sica, R., Clot, F., et al. (2001). Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families. *Annals of Human Genetics*, 65(1), 35-41.

Greco, L., Corazza, G., Babron, M., Clot, F., Fulchignoni-Lataud, M., Percopo, S., et al. (1998). Genome search in celiac disease. *The American Journal of Human Genetics*, 62(3), 669-675.

Greco, L., Romino, R., Coto, I., Di Cosmo, N., Percopo, S., Maglio, M., et al. (2002). The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*, 50(5), 624-628.

Gujral, N., Freeman, H. J., & Thomson, A. (2012). Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol*, 18(42), 6036-6059.

Hadjivassiliou, M., Sanders, D. S., Grünewald, R. A., Woodroffe, N., Boscolo, S., & Aeschlimann, D. (2010). Gluten sensitivity: From gut to brain. *The Lancet Neurology*, 9(3), 318-330.

Haimila, K., Smedberg, T., Mustalahti, K., Mäki, M., Partanen, J., & Holopainen, P. (2004). Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes and Immunity*, 5(2), 85-92.

Hallert, C., Grant, C., Grehn, S., Grännö, C., Hultén, S., Midhagen, G., et al. (2002). Evidence of poor vitamin status in coeliac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(7), 1333-1339.

Hogen Esch, C. E., Rosen, A., Auricchio, R., Romanos, J., Chmielewska, A., Putter, H., et al. (2010). The PreventCD study design: Towards new strategies for the prevention of coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 22(12), 1424-1430.

Holm, K., Mäki, M., Vuolteenaho, N., Mustalahti, K., Ashorn, M., Ruuska, T., et al. (2006). Oats in the treatment of childhood coeliac disease: A 2-year controlled trial and a long-term clinical follow-up study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23(10), 1463-1472.

- Holopainen, P., Arvas, M., Sistonen, P., Mustalahti, K., Collin, P., Mäki, M., et al. (1999). CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to celiac disease. A linkage and family-based association study. *Tissue Antigens*, 53(5), 470-475.
- Hopman, E. G., Kiefte-de Jong, J. C., le Cessie, S., Moll, H. A., Witteman, J. C., Bleeker, S. E., et al. (2007). Food questionnaire for assessment of infant gluten consumption. *Clinical Nutrition*, 26(2), 264-271.
- Hopman, E. G., Pruijn, R., Tabben, E. H., le Cessie, S., & Mearin, M. L. (2012). Food questionnaire for the assessment of gluten intake by children 1 to 4 years old. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(6), 791-796.
- Hüe, S., Mention, J., Monteiro, R. C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., et al. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, 21(3), 367-377.
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R., et al. (2012). European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(1), 136-160.

Ivarsson, A. (2005). The swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach—some lessons to be learnt. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19(3), 425-440.

Ivarsson, A., Myléus, A., Norström, F., van der Pals, M., Rosén, A., Högberg, L., et al. (2012). Reduced prevalence of childhood celiac disease: An effect of changes in infant feeding?

Ivarsson, A., Persson, L., Nyström, L., Ascher, H., Cavell, B., Danielsson, L., et al. (2000). Epidemic of coeliac disease in swedish children. *Acta Paediatrica*, 89(2), 165-171.

Ivarsson, A., Persson, L. Å., Nyström, L., & Hernell, O. (2003). The swedish coeliac disease epidemic with a prevailing twofold higher risk in girls compared to boys may reflect gender specific risk factors. *European Journal of Epidemiology*, 18(7), 677-684.

Ivarsson, A., Hernell, O., Stenlund, H., & Persson, L. A. (2002). Breast-feeding protects against celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), 914-921.

Jackson, J., Eaton, W., Cascella, N., Fasano, A., Santora, D., Sullivan, K., et al. (2014). Gluten sensitivity and relationship to

psychiatric symptoms in people with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 159(2), 539-542.

Jamma, S., Rubio-Tapia, A., Kelly, C. P., Murray, J., Najarian, R., Sheth, S., et al. (2010). Celiac crisis is a rare but serious complication of celiac disease in adults. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 8(7), 587-590.

Kamycheva, E., Goto, T., & Camargo, C. (2016). Celiac disease is associated with reduced bone mineral density and increased FRAX scores in the US national health and nutrition examination survey. *Osteoporosis International*, , 1-10.

Kang, J., Kang, A., Green, A., Gwee, K., & Ho, K. (2013). Systematic review: Worldwide variation in the frequency of coeliac disease and changes over time. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 38(3), 226-245.

Kautto, E., Ivarsson, A., Norström, F., Högberg, L., Carlsson, A., & Hörnell, A. (2014). Nutrient intake in adolescent girls and boys diagnosed with coeliac disease at an early age is mostly comparable to their non-coeliac contemporaries. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 27(1), 41-53.

Kilmartin, C., Lynch, S., Abuzakouk, M., Wieser, H., & Feighery, C. (2003). Avenin fails to induce a Th1 response in coeliac tissue following in vitro culture. *Gut*, *52*(1), 47-52.

Kirkpatrick, S. I., Reedy, J., Butler, E. N., Dodd, K. W., Subar, A. F., Thompson, F. E., et al. (2014). Dietary assessment in food environment research: A systematic review. *American Journal of Preventive Medicine*, *46*(1), 94-102.

Kochhar, R., Sachdev, S., Kochhar, R., Aggarwal, A., Sharma, V., Prasad, K., et al. (2012). Prevalence of coeliac disease in healthy blood donors: A study from north india. *Digestive and Liver Disease*, *44*(6), 530-532.

Koninckx, C. R., Serra, J. D., Villares, J. M., Martín, J. D., de Villasante, G. C., & Allue, I. P. (2015). La introducción del gluten en la dieta del lactante. recomendaciones de un grupo de expertos. *Anales De Pediatría*, *83*. (5) pp. 355. e1-355. e7.

Koning, F. (2012). Celiac disease: Quantity matters. *Seminars in Immunopathology*, *34*. (4) pp. 541-549.

Koning, F., Schuppan, D., Cerf-Bensussan, N., & Sollid, L. M. (2005). Pathomechanisms in celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *19*(3), 373-387.

Kumar, V., Wijmenga, C., & Withoff, S. (2012). From genome-wide association studies to disease mechanisms: Celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Seminars in Immunopathology*, 34. (4) pp. 567-580.

Kupper, C. (2005). Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology*, 128(4), S121-S127.

Lagerqvist, C., Dahlbom, I., Hansson, T., Jidell, E., Juto, P., Olcen, P., et al. (2008). Antigliadin immunoglobulin A best in finding celiac disease in children younger than 18 months of age. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 47(4), 428-435.

Lionetti, E., Castellaneta, S., Francavilla, R., Pulvirenti, A., Tonutti, E., Amarri, S., et al. (2014). Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *New England Journal of Medicine*, 371(14), 1295-1303.

Lionetti, E., Castellaneta, S., Pulvirenti, A., Tonutti, E., Francavilla, R., Fasano, A., et al. (2012). Prevalence and natural history of potential celiac disease in at-family-risk infants prospectively investigated from birth. *The Journal of Pediatrics*, 161(5), 908-914. e2.

- Liu, E., Lee, H., Aronsson, C. A., Hagopian, W. A., Koletzko, S., Rewers, M. J., et al. (2014). Risk of pediatric celiac disease according to HLA haplotype and country. *New England Journal of Medicine*, 371(1), 42-49.
- Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H., et al. (2013). The oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1), 43-52.
- Lundin, K. E., Nilsen, E. M., Scott, H. G., Loberg, E. M., Gjoen, A., Bratlie, J., et al. (2003). Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*, 52(11), 1649-1652.
- Lurz E, Scheidegger U, Spalinger J, et al.(2009). Clinical presentation of celiac disease and the diagnostic accuracy of serologic markers in children. *European Journal of Pediatrics*;168 (7),839–45.
- Magkos, F., Manios, Y., Babaroutsi, E., & Sidossis, L. S. (2006). Development and validation of a food frequency questionnaire for assessing dietary calcium intake in the general population. *Osteoporosis International*, 17(2), 304-312.

- Mäki, M. (2012). Coeliac disease: Lack of consensus regarding definitions of coeliac disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(6), 305-306.
- Mäki, M., Mustalahti, K., Kokkonen, J., Kulmala, P., Haapalahti, M., Karttunen, T., et al. (2003). Prevalence of celiac disease among children in Finland. *New England Journal of Medicine*, 348(25), 2517-2524.
- Markle, J., & Fish, E. N. (2014). Sex matters in immunity. *Trends in Immunology*, 35(3), 97-104.
- Marriott, L., Robinson, S., Poole, J., Borland, S., Godfrey, K., Law, C., et al. (2008). What do babies eat? evaluation of a food frequency questionnaire to assess the diets of infants aged 6 months. *Public Health Nutrition*, 11(07), 751-756.
- Marriott, L. D., Inskip, H. M., Borland, S. E., Godfrey, K. M., Law, C. M., & Robinson, S. M. (2009). What do babies eat? evaluation of a food frequency questionnaire to assess the diets of infants aged 12 months. *Public Health Nutrition*, 12(7), 967.
- Martin, J., Geisel, T., Maresch, C., Krieger, K., & Stein, J. (2013). Inadequate nutrient intake in patients with celiac disease: Results from a German dietary survey. *Digestion*, 87(4), 240-246.

Mearin, M. L. (2007). Celiac disease among children and adolescents.

Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, 37(3), 86-105.

Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Montuori, M., Viola,

F., et al. (2008). HLA-DQ and susceptibility to celiac disease: Evidence for gender differences and parent-of-origin effects. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(4), 997-1003.

Mitt, K., & Uiho, O. (1998). Low cereal intake in estonian infants: The

possible explanation for the low frequency of coeliac disease in estonia. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52(2), 85-88.

Molberg, Ø., Uhlen, A. K., Jensen, T., Flæte, N. S., Fleckenstein, B.,

Arentz-Hansen, H., et al. (2005). Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: Implications for celiac disease. *Gastroenterology*, 128(2), 393-401.

Mones, R. L., Atienza, K. V., Youssef, N. N., Verga, B., Mercer, G. O.,

& Rosh, J. R. (2007). Celiac crisis in the modern era. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 45(4), 480-483.

Monsuur, A. J., de Bakker, P. I., Alizadeh, B. Z., Zhernakova, A.,

Bevova, M. R., Strengman, E., et al. (2005). Myosin IXB variant

increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nature Genetics*, 37(12), 1341-1344.

Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., et al. (2010). The prevalence of celiac disease in europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine*, 42(8), 587-595.

Myleus, A., Ivarsson, A., Webb, C., Danielsson, L., Hernell, O., Hogberg, L., et al. (2009). Celiac disease revealed in 3% of swedish 12-year-olds born during an epidemic. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(2), 170-176.

Nadal, I., Donant, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2007). Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *Journal of Medical Microbiology*, 56(12), 1669-1674.

Naggara, O., Raymond, J., Guilbert, F., Roy, D., Weill, A., & Altman, D. G. (2011). Analysis by categorizing or dichotomizing continuous variables is inadvisable: An example from the natural history of unruptured aneurysms. *AJNR.American Journal of Neuroradiology*, 32(3), 437-440.

- Namatovu, F., Sandström, O., Olsson, C., Lindkvist, M., & Ivarsson, A. (2014). Celiac disease risk varies between birth cohorts, generating hypotheses about causality: Evidence from 36 years of population-based follow-up. *BMC Gastroenterology*, *14*(1), 59.
- Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, *11*(12), 823-836.
- Nijeboer, P., van Wanrooij, R. L., Tack, G. J., Mulder, C. J., & Bouma, G. (2013). Update on the diagnosis and management of refractory coeliac disease. *Gastroenterology Research and Practice*, *2013*, 518483.
- Nikulina, M., Habich, C., Flohe, S. B., Scott, F. W., & Kolb, H. (2004). Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *173*(3), 1925-1933.
- Nistico, L., Fagnani, C., Coto, I., Percopo, S., Cotichini, R., Limongelli, M. G., et al. (2006). Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in italian twins. *Gut*, *55*(6), 803-808.
- Norris, J. M., Barriga, K., Hoffenberg, E. J., Taki, I., Miao, D., Haas, J. E., et al. (2005). Risk of celiac disease autoimmunity and timing

of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *Jama*, 293(19), 2343-2351.

Nunez, C., Marquez, A., Varade, J., Martinez, A., Polanco, I., Maluenda, C., et al. (2006). No evidence of association of the MYO9B polymorphisms with celiac disease in the spanish population. *Tissue Antigens*, 68(6), 489-492.

Oberhuber, G., Granditsch, G., & Vogelsang, H. (1999). The histopathology of coeliac disease: Time for a standardized report scheme for pathologists. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 11(10), 1185.

Öhlund, K., Olsson, C., Hernell, O., & Öhlund, I. (2010). Dietary shortcomings in children on a gluten-free diet. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 23(3), 294-300.

Olivares, M., Neef, A., Castillejo, G., Palma, G. D., Varea, V., Capilla, A., et al. (2015). The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*, 64(3), 406-417.

Olsson, C., Stenlund, H., Hörnell, A., Hernell, O., & Ivarsson, A. (2009). Regional variation in celiac disease risk within sweden

revealed by the nationwide prospective incidence register. *Acta Paediatrica*, 98(2), 337-342.

Palma, G. d., Nova, E., Pozo Rubio, T., & Sanz, Y. (2010). Interplay between human leukocyte antigen genes and the microbial colonization process of the newborn intestine.

Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5(7), e177.

Parra-Medina, R., Molano-Gonzalez, N., Rojas-Villarraga, A., Agmon-Levin, N., Arango, M., Shoenfeld, Y., et al. (2015). Prevalence of celiac disease in latin america: A systematic review and meta-regression. *PloS One*, 10(5), e0124040.

Pascual, M. a. C., u n Riechmann, E Rom, Torres, J. B., Pascual, A. C., Moreno, O. C., & u ndez Rincón, A Fern. (2002). Enfermedad cel ó aca silente: Explorando el iceberg en poblaciòn escolar. *Anales De Pediatr ó a*, 57(4), 321-326.

Persson, L., Ivarsson, A., & Hernell, O. (2002). Breast-feeding protects against celiac disease in childhood—epidemiological evidence. *Integrating population outcomes, biological*

mechanisms and research methods in the study of human milk and lactation (pp. 115-123) Springer.

Peters, U., Schneeweiss, S., Trautwein, E. A., & Erbersdobler, H. F. (2001). A case-control study of the effect of infant feeding on celiac disease. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 45(4), 135-142.

Pietzak, M. M., Schofield, T. C., McGinniss, M. J., & Nakamura, R. M. (2009). Stratifying risk for celiac disease in a large at-risk united states population by using HLA alleles. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(9), 966-971.

Pinto-Sanchez, M. I., Bercik, P., Verdu, E. F., & Bai, J. C. (2015). Extraintestinal manifestations of celiac disease. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 33(2), 147-154.

Pisapia, L., Camarca, A., Picascia, S., Bassi, V., Barba, P., Del Pozzo, G., et al. (2016). HLA-DQ2. 5 genes associated with celiac disease risk are preferentially expressed with respect to non-predisposing HLA genes: Implication for anti-gluten T cell response. *Journal of Autoimmunity*, 70, 63-72.

Pooni, P. A., Chhina, R. S., Jaina, B. K., Singh, D., & Gautam, A. (2006). Clinical and anthropometric profile of children with celiac

disease in punjab (north india). *Journal of Tropical Pediatrics*, 52(1), 30-33.

Popat, S., Hearle, N., Hogberg, L., Braegger, C., O'donoghue, D., Falth-Magnusson, K., et al. (2002). Variation in the CTLA4/CD28 gene region confers an increased risk of coeliac disease. *Annals of Human Genetics*, 66(2), 125-137.

Reilly, N. R., & Green, P. H. (2012). Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Seminars in Immunopathology*, , 34. (4) pp. 473-478.

Reilly, N. R., Aguilar, K., Hassid, B. G., Cheng, J., Defelice, A. R., Kazlow, P., et al. (2011). Celiac disease in normal-weight and overweight children: Clinical features and growth outcomes following a gluten-free diet. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(5), 528-531.

Ribeiro, M., Rodriguez-Quijano, M., Nunes, F. M., Carrillo, J. M., Branlard, G., & Igrejas, G. (2016). New insights into wheat toxicity: Breeding did not seem to contribute to a prevalence of potential celiac disease's immunostimulatory epitopes. *Food Chemistry*, 213, 8-18.

- Riestra, S., Fernandez, E., Rodrigo, L., Garcia, S., & Ocio, G. (2000). Prevalence of coeliac disease in the general population of northern Spain: Strategies of serologic screening. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35(4), 398-402.
- Rishi, A. R., Rubio-Tapia, A., & Murray, J. A. (2016). Refractory celiac disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 10(4), 537-546.
- Rodrigo Sáez, L., Fuentes Álvarez, D., Pérez Martínez, I., Álvarez Mieres, N., Niño García, P., García, F., et al. (2011). Diferencias entre la enfermedad celíaca infantil y del adulto. *Revista Española De Enfermedades Digestivas*, 103(5), 238-243.
- Romanos, J., & Wijmenga, C. (2010). Predicting susceptibility to celiac disease by genetic risk profiling. *Annals of Gastroenterology & Hepatology*, 1, 1-9.
- Rostom, A., Dubé, C., Cranney, A., Saloojee, N., Sy, R., Garritty, C., et al. (2005). The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: A systematic review. *Gastroenterology*, 128(4), S38-S46.

Royston, P., Altman, D. G., & Sauerbrei, W. (2006). Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: A bad idea. *Statistics in Medicine*, 25(1), 127-141.

Rubio-Tapia, A., & Murray, J. A. (2010). Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut*, 59(4), 547-557.

Salentijn, E. M., Goryunova, S. V., Bas, N., van der Meer, Ingrid M, van den Broeck, Hetty C, Bastien, T., et al. (2009). Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous gli-2 loci. *BMC Genomics*, 10(1), 48.

Sanchez, E., De Palma, G., Capilla, A., Nova, E., Pozo, T., Castillejo, G., et al. (2011). Influence of environmental and genetic factors linked to celiac disease risk on infant gut colonization by bacteroides species. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5316-5323.

Sanchez, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2012). Intestinal staphylococcus spp. and virulent features associated with coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology*, 65(9), 830-834.

- Sapone, A., Lammers, K. M., Casolaro, V., Cammarota, M., Giuliano, M. T., De Rosa, M., et al. (2011). Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: Celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Medicine*, 9(1), 23.
- Savilahti E, Kolho KL, Westerholm-Ormio M, et al. (2010). Clinics of coeliac disease in children in the 2000s. *Acta Pædiatrica*, 99(7), 1026–103.
- Sellitto, M., Bai, G., Serena, G., Fricke, W. F., Sturgeon, C., Gajer, P., et al. (2012). Proof of concept of microbiome-metabolome analysis and delayed gluten exposure on celiac disease autoimmunity in genetically at-risk infants. *PloS One*, 7(3), e33387.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., et al. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5590), 2275-2279.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., & Lafiandra, D. (2003). Genetics of wheat gluten proteins. *Advances in Genetics*, 49, 111-184.

- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, *53*(370), 947-958.
- Shim, J. S., Oh, K., & Kim, H. C. (2014). Dietary assessment methods in epidemiologic studies. *Epidemiology and Health*, *36*, e2014009.
- Silano, M., Di Benedetto, R., Maialetti, F., De Vincenzi, A., Calcaterra, R., Cornell, H. J., et al. (2007). Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral lymphocytes. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *42*(11), 1302-1305.
- Singh, P., Arora, S., Lal, S., Strand, T. A., & Makharia, G. K. (2015). Risk of celiac disease in the first-and second-degree relatives of patients with celiac disease: A systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, *110*(11), 1539-48,
- Singh, P., & Garber, J. J. (2016). Implementation and adherence to osteoporosis screening guidelines among coeliac disease patients. *Digestive and Liver Disease*, *48*(12), 1451-1456.
- Snape, J., & Pánková, K. (2007). *Triticum aestivum* (wheat). *ELS*,

- Sollid, L. M. (2000). Molecular basis of celiac disease. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 53-81.
- Sollid, L. M., & Jabri, B. (2013). Triggers and drivers of autoimmunity: Lessons from coeliac disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 294-302.
- Sollid, L. M. (2002). Breast milk against coeliac disease. *Gut*, 51(6), 767-768.
- Song, G. G., Kim, J., Kim, Y. H., & Lee, Y. H. (2013). Association between CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to celiac disease: A meta-analysis. *Human Immunology*, 74(9), 1214-1218.
- Stepniak, D., & Koning, F. (2006). Celiac disease—sandwiched between innate and adaptive immunity. *Human Immunology*, 67(6), 460-468.
- Stordal, K., White, R. A., & Eggesbo, M. (2013). Early feeding and risk of celiac disease in a prospective birth cohort. *Pediatrics*, 132(5), e1202-9.
- Szajewska, H., Shamir, R., Chmielewska, A., Pieścik-Lech, M., Auricchio, R., Ivarsson, A., et al. (2015). Systematic review with meta-analysis: Early infant feeding and coeliac disease—update

2015. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 41(11), 1038-1054.

Szajewska, H., Shamir, R., Mearin, L., Ribes-Koninckx, C., Catassi, C., Domellof, M., et al. (2016). Gluten introduction and the risk of coeliac disease: A position paper by the european society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(3), 507-513.

Telega G, Bennet T, Werlin S. (2008). Emerging new clinical patterns in the presentation of celiac disease. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 162(2), 164–8.

Theethira, T. G., Dennis, M., & Leffler, D. A. (2014). Nutritional consequences of celiac disease and the gluten-free diet. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 8(2), 123-129.

Theethira, T. G., & Dennis, M. (2015). Celiac disease and the gluten-free diet: Consequences and recommendations for improvement. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 33(2), 175-182.

Topal, E., Catal, F., Acar, N. Y., ERMiŞTEKİN, H., SİNANOĞLU, M. S., Karabiber, H., et al. (2015). Vitamin and mineral deficiency in children newly diagnosed with celiac disease. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(4), 833-836.

- Trynka, G., Hunt, K. A., Bockett, N. A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., et al. (2011). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature Genetics*, 43(12), 1193-1201.
- Trynka, G., Wijmenga, C., & van Heel, D. A. (2010). A genetic perspective on coeliac disease. *Trends in Molecular Medicine*, 16(11), 537-550.
- Urban-Kowalczyk, M., OEmigielski, J., & Gmitrowicz, A. (2014). Neuropsychiatric symptoms and celiac disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 1961-1964.
- Vajro, P., Paoletta, G., Maggiore, G., & Giordano, G. (2013). Pediatric celiac disease, cryptogenic hypertransaminasemia, and autoimmune hepatitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(6), 663-670.
- Van Belzen, M. J., Meijer, J. W., Sandkuijl, L. A., Bardoel, A. F., Mulder, C. J., Pearson, P. L., et al. (2003). A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology*, 125(4), 1032-1041.
- Van den Broeck, Hetty C, de Jong, H. C., Salentijn, E. M., Dekking, L., Bosch, D., Hamer, R. J., et al. (2010). Presence of celiac disease

epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: Wheat breeding may have contributed to increased prevalence of celiac disease. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(8), 1527-1539.

van Heel, D. A., Franke, L., Hunt, K. A., Gwilliam, R., Zhernakova, A., Inouye, M., et al. (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nature Genetics*, 39(7), 827-829.

van Herpen, T. W., Goryunova, S. V., van der Schoot, J., Mitreva, M., Salentijn, E., Vorst, O., et al. (2006). Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC Genomics*, 7(1), 1.

van Overbeek, F. M., Uil-Dieterman, I. G., Mol, I. W., Köhler-Brands, L., Heymans, H. S., & Mulder, C. J. (1997). The daily gluten intake in relatives of patients with coeliac disease compared with that of the general dutch population. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 9(11), 1097-1099.

Vaquero, L., Caminero, A., Nunez, A., Hernando, M., Iglesias, C., Casqueiro, J., et al. (2014). Coeliac disease screening in first-degree relatives on the basis of biopsy and genetic risk. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 26(3), 263-267.

- Vici, G., Belli, L., Biondi, M., & Polzonetti, V. (2016). Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1236-1241.
- Vitoria, J., Arrieta, A., Astigarraga, I., Garcia-Masdevall, D., & Rodriguez-Soriano, J. (1994). Use of serological markers as a screening test in family members of patients with celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 19(3), 304-309.
- Vivas Alegre, S., & Ruiz de Morales, J. M. (2008). Refractory celiac disease. [Enfermedad celiaca refractaria] *Gastroenterología y Hepatología*, 31(5), 310-316.
- Vriezinga, S. L., Auricchio, R., Bravi, E., Castillejo, G., Chmielewska, A., Crespo Escobar, P., et al. (2014). Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med*, 2014(371), 1304-1315.
- Wieser, H. (2000). Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species I. qualitative and quantitative composition of gluten protein types. *European Food Research and Technology*, 211(4), 262-268.

- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115-119.
- Wolters, V. M., & Wijmenga, C. (2008). Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(1), 190-195.
- Woodward, J. (2016). Improving outcomes of refractory celiac disease—current and emerging treatment strategies. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 9, 225.
- Xie, Z., Wang, C., Wang, K., Wang, S., Li, X., Zhang, Z., et al. (2010). Molecular characterization of the celiac disease epitope domains in α -gliadin genes in *aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 121(7), 1239-1251.
- Yuan, J., Gao, J., Li, X., Liu, F., Wijmenga, C., Chen, H., et al. (2013). The tip of the “celiac iceberg” in china: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 8(12), e81151.
- Zhang, Y., Tang, J., Zhang, Y., Yan, J., Xiao, Y., Zhang, Y., et al. (2011). QTL mapping for quantities of protein fractions in bread wheat (*triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 122(5), 971-987.

Zhu, A., Kaneshiro, M., & Kaunitz, J. D. (2010). Evaluation and treatment of iron deficiency anemia: A gastroenterological perspective. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(3), 548-559.

Žilić, S., Barać, M., Pešić, M., Dodig, D., & Ignjatović-Mićić, D. (2011). Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5878-5894.

VII. ANEXOS

ANEXO I. Plantilla de registro dietético utilizado para la validación de los CFC.

	DÍA		
DESAYUNO	Alimento:	Marca:	Cantidad:
ALMUERZO	Alimento:	Marca:	Cantidad:
COMIDA	Alimento:	Marca:	Cantidad:
MERIENDA	Alimento:	Marca:	Cantidad:
CENA	Alimento:	Marca:	Cantidad:
ENTRE HORAS	Alimento:	Marca:	Cantidad:

ANEXO II. Cuestionario de frecuencia de consumo - 1 (de 7 a 12 meses).

Número:
 Fecha:/...../.....
 Edad:
 Nombre (INICIALES):

Cuestionario dietético

1. ¿Recibe el niño/a exclusivamente lactancia materna? No
 Sí, pasa a la pregunta nº 4
2. ¿A qué edad dejaste de darle lactancia materna?
 Nunca le he dado
 Sigo dándole
 A los meses
3. ¿Qué tipo de fórmula adaptada le da a su hijo?
 Normal
 Cantidad:
 Marca comercial:
 Adaptada para alergias alimentarias/hidrolizadas
 Cantidad:
 Marca comercial:
 Anti-reflujo/ anti-regurgitación
 Cantidad:
 Marca comercial:
 Otras
 Cantidad:
 Marca comercial:
4. ¿Alimenta a su hijo con leche con cereales con gluten?
 no, pasa a la pregunta número 6.
 Si. Marca comercial:
5. ¿Qué cantidad de cereales con gluten le da a su hijo al día?
 Si es con biberón: 1 – 3 cacitos 1 vez al día
 2-3 veces al día
 4-5 veces al día
 6 veces al día
 4 – 6 cacitos 1 vez al día
 2-3 veces al día
 4-5 veces al día
 6 veces al día
 Más de 6 cacitos 1 vez al día
 2-3 veces al día
 4-5 veces al día
 Si es papilla:
 Menos de ½ plato
 ½ - 1 plato
 1 – 1 ½ platos
 1 ½ - 2 platos
 Más de 2 platos
6. Cuando le da potitos salados (no casera) a su hijo/a, ¿qué marca usa normalmente?
 No utilizo "comida preparada"
 Hero:
 - buenas noches- crema de verdura y pasta
 - del mercado- verdura con pavo y pasta
 Otros:
7. Cuando le da "potitos de fruta" a su hijo/a, ¿qué marca usa normalmente?
 No utilizo "comida preparada"
 Hero: macedonia de frutas con cereales
 Nestlé: cocktail de frutas y cereales
 Otros:

ANEXO II (*continuación*). Cuestionario de frecuencia de consumo -1 (de 7 a 12 meses).

EDAD:																				
PRODUCTOS	FRECUENCIA						EDAD DE INTRODUCCIÓN													
	NUNCA	< 1 /semana	1-3 veces/sem	4-6 veces/sem	1 vez al día	2 veces día	3 o más veces día	<6m	6-7 m	<7m	7-8 m	<8m	8-9 m	<9m	9-10m	<10 m	10-11m	<11m	11-12m	
Pan (1 porción 40 g)																				
Galletas (María, María Dorada, Rio Petit y Tosta Rica)																				
Galletas Dinosaurios Lú																				
Cruasanes (1 porción=25g)																				
Magdalenas (1 porción =30g)																				
Rosquilletas (unidad)																				
Chocolate (1 cuadrado)																				
Cereales (Nestlé, Milupa, Ordesa, Hero Baby)																				
Cereales (Nutribén)																				
Pasta: (macarrones, estrellitas, espaguetis.) (1 porción= 50 g)																				
Productos rebozados caseros (1 porción=75g)																				
Potitos de fruta (con gluten)																				
Potitos salados (con gluten)																				

Anexo III. Cuestionario de frecuencia de consumo – 2 (de 13 a 36 meses).

Número:
 Fecha:/...../.....
 Edad:
 Nombre (INICIALES):

Cuestionario dietético

1. ¿Recibe el niño/a exclusivamente lactancia materna? No
 Si, pasa a la pregunta nº 4
2. ¿A que edad dejaste de darle lactancia materna?
 Nunca le he dado
 Sigo dándole
 A los meses
3. ¿Qué tipo de leche adaptada le da a su hijo?
 Normal
 Cantidad:
 Marca comercial:
 Adaptada para alergias alimentarias/hidrolizadas
 Cantidad:
 Marca comercial:
 Anti-reflujo/ anti-regurgitación
 Cantidad:
 Marca comercial:
 Otras
 Cantidad:
 Marca comercial:
4. ¿Alimenta a su hijo con cereales con gluten?
 no, pasa a la pregunta número 6.
 Si. Marca comercial:
5. ¿Qué cantidad de cereales le da a su hijo al día? Indicar el número de cacitos o cucharadas, ya sea en biberón o en papilla.
 1 – 3 cacitos:
 1 vez al día
 2-3 veces al día
 4-5 veces al día
 6 veces al día
 4 – 6 cacitos
 1 vez al día
 2-3 veces al día
 4-5 veces al día
 6 veces al día
 Más de 6 cacitos
 1 vez al día
 2-3 veces al día
 4-5 veces al día
 6 veces al día
 Si son cereales enteros (tipo Kellogg), que cantidad y marca comercial?
6. Cuando le da potitos salados (no casera) a su hijo/a, ¿qué marca usa normalmente?
 No utilizo “comida preparada”
 Hero:
 - buenas noches- crema de verdura y pasta
 - del mercado- verdura con pavo y pasta
 Otros:
7. Cuando le da “potitos de fruta” a su hijo/a, ¿qué marca usa normalmente?
 No utilizo “comida preparada”
 Hero macedonia de frutas con cereales
 Nestlé: cocktail de frutas y cereales
 Otros:

Anexo III (continuación). Cuestionario de frecuencia de consumo – 2 (de 12 a 36 meses)

8. ¿Con qué frecuencia le da a su hijo/hija los siguientes productos?

PRODUCTOS	NUNCA	Menos de 1 /semana	1-3 veces/sem	4-6 veces/sem	1 vez al día	2 veces día	3 o más veces día
Pan (1 porción 40 g).							
Pan sándwich (1 rebanada=30g)							
Galletas (María, María Dorada, Rio Petit y Tosta Rica)							
Galletas Dinosaurios Lú							
Galletas con chocolate (tipo principe)							
Biscochitos (1 porción=20g) y Bollería (curasanes, magdalenas)(1 porción=25g)							
Ensamadas (1 porción=35g)							
Rosquilletas (unidad)							
Cereales (Nestlé,Milupa,Ordesa,Hero Baby)							
Cereales (Nutribén)							
Cereales (kellogs)							
Cereales con cacao							
Pasta: (estrellitas, sémola trigo,letritas ...) (ración sopa)							
Pasta: (spaguetis, macarrones, lacitos...) (plato pequeño)							
Varitas de merluza (1 porción=75g)							
Croquetas de pollo congeladas (1 porción=75g)							
Pollo empanado (1 porción=75g)							
Postres lácteos con harina (cereales o galleta)							
Potitos de fruta (con gluten)							
Potitos salados (con gluten)							

*En la casilla de “3 o más”, especificar la cantidad.

Anexo IV. Ingesta media de gluten por producto, país y mes.

	PAN (g/día)											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	0.30	0.61	0.84	1.01	1.17	1.25	1.41	1.53	1.55	1.61	1.84	1.80
Países Bajos	2.88	3.85	4.71	4.81	5.11	5.50	5.62	5.65	6.02	6.18	6.05	6.38
Italia	0.41	0.58	1.17	0.92	1.39	1.88	1.07	1.84	1.41	2.46	0.91	2.02
Hungría	1.89	3.04	3.53	4.40	5.30	4.89	5.41	5.99	5.20	5.48	5.88	6.12
	PASTA (g/día)											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	0.06	0.15	0.23	0.34	0.46	0.52	0.54	0.64	0.70	0.71	0.78	0.77
Países Bajos	0.10	0.12	0.17	0.21	0.20	0.20	0.22	0.22	0.22	0.20	0.22	0.23
Italia	2.36	2.96	3.49	3.98	3.95	3.41	4.00	4.20	4.00	4.16	2.78	4.02
Hungría	0.64	0.78	0.94	1.03	1.21	0.98	1.03	1.09	0.93	0.95	0.97	0.99
	GALLETAS (g/día)											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	0.48	0.51	0.53	0.57	0.56	0.55	0.58	0.56	0.53	0.48	0.48	0.47
Países Bajos	0.33	0.34	0.36	0.36	0.30	0.29	0.31	0.30	0.34	0.33	0.40	0.37
Italia	1.51	1.25	1.93	2.08	2.05	2.09	2.18	1.77	2.04	1.81	1.24	1.48
Hungría	1.19	1.40	1.37	1.67	1.90	1.33	1.45	1.56	1.38	1.49	1.46	1.52

Anexo IV (continuación). Ingesta media de gluten por producto, país y mes.

	CEREALES INFANTILES (g/día)											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	1.55	1.64	1.59	1.68	1.45	1.44	1.16	1.10	0.77	0.60	0.48	0.35
Países Bajos	1.31	1.44	1.58	1.39	1.18	1.07	0.83	0.57	0.46	0.52	0.36	0.34
Italia	0.08	0.05	0.00	0.08	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Hungría	1.16	1.37	0.86	0.83	0.83	0.63	0.65	0.65	0.51	0.46	0.44	0.47
	BOLLERÍA (g/día)											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	0.00	0.03	0.06	0.08	0.13	0.16	0.16	0.19	0.20	0.21	0.26	0.26
Países Bajos	0.03	0.08	0.13	0.18	0.20	0.24	0.19	0.25	0.24	0.24	0.23	0.28
Italia	0.26	0.34	0.65	0.58	0.76	0.79	0.71	1.30	1.18	1.27	0.74	1.40
Hungría	0.25	0.43	0.75	1.15	1.40	1.42	1.67	1.71	1.88	2.00	2.03	2.10
	OTROS (g/día)											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	0.17	0.25	0.26	0.26	0.27	0.26	0.28	0.30	0.37	0.37	0.47	0.53
Países Bajos	0.33	0.48	0.54	0.59	0.78	0.80	0.86	0.83	0.98	0.88	0.97	1.04
Italia	0.02	0.17	0.26	0.24	0.62	0.61	0.67	0.95	1.14	1.13	0.72	1.23
Hungría	0.03	0.05	0.08	0.12	0.18	0.15	0.20	0.25	0.24	0.27	0.30	0.33

Anexo V. Contribución de los diferentes productos con gluten a la ingesta media diaria de gluten en cada país.

	ESPAÑA											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
IMDG TOTAL (g/día)	2.55	3.14	3.45	3.87	4.01	4.20	4.15	4.37	4.20	4.15	4.46	4.40
Pan (%)	11.84	18.42	23.37	24.30	28.27	29.72	33.89	34.95	36.93	38.83	41.28	40.85
Galletas (%)	18.98	16.36	15.21	14.81	14.01	13.21	13.89	12.84	12.52	12.59	10.71	10.73
Cereales infantiles (%)	60.10	52.15	46.08	43.39	36.23	35.17	28.04	25.11	18.44	15.57	10.70	7.98
Pasta (%)	2.18	4.51	6.47	8.74	11.50	12.10	13.11	14.57	16.69	17.50	17.45	17.55
Bollería (%)	0.26	0.81	1.78	2.08	3.15	3.76	3.86	4.27	4.88	5.17	5.85	5.85
Otros (%)	6.71	7.98	7.52	6.81	6.84	6.17	6.76	6.96	8.82	9.05	10.48	12.01
	PAÍSES BAJOS											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
IMDG TOTAL (g/día)	5.27	6.36	7.68	7.70	8.04	8.52	8.30	8.09	8.60	8.77	8.85	9.19
Pan (%)	55.66	60.55	61.29	62.43	63.61	64.57	67.74	69.81	70.50	70.43	70.41	70.42
Galletas (%)	7.50	5.38	4.67	4.62	3.73	3.41	3.68	3.69	3.95	3.80	4.50	4.01
Cereales infantiles (%)	24.90	22.63	20.62	18.09	16.72	12.54	10.97	8.50	6.40	5.97	5.04	4.73
Pasta (%)	2.98	1.89	2.19	2.74	2.60	2.40	2.66	2.68	2.60	2.30	2.52	2.48
Bollería (%)	0.56	1.24	1.74	2.30	2.45	2.82	2.60	3.12	2.80	2.70	2.60	3.60
Otros (%)	6.60	7.62	7.70	7.66	9.75	9.43	10.37	10.70	11.45	11.50	11.22	11.50

Anexo V (continuación). Contribución de los diferentes productos con gluten a la ingesta media diaria de gluten en cada país.

	ITALIA											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
IMDG TOTAL (g/día)	4.85	5.43	7.93	5.80	8.81	9.76	8.93	10.78	11.82	12.37	11.51	12.10
Pan (%)	9.44	10.63	14.90	15.35	15.77	19.24	14.75	17.81	18.96	19.88	17.92	19.69
Galletas (%)	31.14	22.94	24.32	25.08	23.25	21.40	24.40	16.43	17.56	16.61	15.81	14.25
Cereales infantiles (%)	1.61	1.01	0.05	1.33	0.40	0.00	0.00	0.02	0.00	0.08	0.00	0.00
Pasta (%)	48.63	54.58	48.20	45.70	44.85	44.20	44.83	41.22	39.82	40.62	44.11	43.22
Bollería (%)	5.33	6.21	8.16	9.14	8.67	8.07	7.98	12.89	11.50	11.55	11.44	11.57
Otros (%)	2.35	3.13	3.30	4.22	7.08	6.24	7.50	8.79	9.64	9.94	8.27	10.20
	HUNGRÍA											
	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
IMDG TOTAL (g/día)	5.27	6.36	7.68	7.70	8.04	8.52	8.30	8.09	8.60	8.77	8.85	9.19
Pan (%)	55.66	60.55	61.29	62.43	63.61	64.57	67.74	69.81	70.50	70.43	70.41	70.42
Galletas (%)	7.50	5.38	4.67	4.62	3.73	3.41	3.68	3.69	3.95	3.80	4.50	4.01
Cereales infantiles (%)	24.90	22.63	20.62	18.09	16.72	12.54	10.97	8.50	6.40	5.97	5.04	4.73
Pasta (%)	2.98	1.89	2.19	2.74	2.60	2.40	2.66	2.68	2.60	2.30	2.52	2.48
Bollería (%)	0.56	1.24	1.74	2.30	2.45	2.82	2.60	3.12	2.80	2.70	2.60	3.60
Otros (%)	6.60	7.62	7.70	7.66	9.75	9.43	10.37	10.70	11.45	11.50	11.22	11.50

Anexo VI. Ingesta media diaria de gluten de los diferentes productos, por mes, por país, y por casos diagnosticados de enfermedad celiaca (EC) y casos sanos (no-EC)

	PAN (g/día)												
	Casos	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	no-EC	0.30	0.61	0.84	1.01	1.17	1.25	1.41	1.53	1.55	1.61	1.84	1.80
	EC	0.24	0.62	0.67	0.90	0.84	0.99	1.44	1.25	1.11	1.44	1.30	1.46
Países bajos	no-EC	2.88	3.85	4.71	4.81	5.11	5.50	5.62	5.65	6.02	6.18	6.05	6.38
	EC	2.29	3.66	4.84	4.22	5.00	6.03	5.81	6.01	5.96	6.37	6.48	5.71
Italia	no-EC	0.41	0.58	1.17	0.92	1.39	1.88	1.07	1.84	1.41	2.46	1.91	2.02
	EC	0.33	0.82	1.2	0.83	1.70	1.55	0.13	1.51	1.54	2.38	1.58	1.90
Hungría	no-EC	1.89	3.04	3.53	4.40	5.30	4.89	5.41	5.99	5.20	5.48	5.88	6.12
	EC	1.89	2.95	3.87	4.53	5.22	4.71	5.26	5.55	4.94	4.69	5.92	5.69

Anexo VI (continuación). Ingesta media diaria de gluten de los diferentes productos, por mes, por país, y por casos diagnosticados de enfermedad celiaca (EC) y casos sanos (no-EC)

	PASTA (g/día)												
	Casos	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	no-EC	0.06	0.15	0.23	0.34	0.46	0.52	0.54	0.64	0.70	0.71	0.78	0.77
	EC	0.35	0.44	0.53	0.70	0.70	0.65	0.83	0.83	1.05	0.80	1.36	1.17
Países bajos	no-EC	0.10	0.12	0.17	0.21	0.20	0.20	0.22	0.22	0.22	0.20	0.22	0.23
	EC	0.28	0.26	0.32	0.36	0.29	0.29	0.28	0.31	0.31	0.31	0.39	0.35
Italia	no-EC	2.36	2.96	3.49	3.98	3.95	3.41	4.00	4.20	4.00	4.16	2.78	4.02
	EC	2.57	2.63	2.95	3.17	3.43	3.51	3.16	5.10	4.60	4.91	3.17	3.17
Hungría	no-EC	0.64	0.78	0.94	1.03	1.21	0.98	1.03	1.09	0.93	0.95	0.97	0.99
	EC	0.60	0.74	1.02	1.13	1.48	1.18	1.13	1.07	0.96	0.94	0.98	0.95

Anexo VI (continuación). Ingesta media diaria de gluten de los diferentes productos, por mes, por país, y por casos diagnosticados de enfermedad celiaca (EC) y casos sanos (no-EC)

	GALLETAS (g/día)												
	Casos	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	no-EC	0.48	0.51	0.53	0.57	0.56	0.55	0.58	0.56	0.53	0.48	0.48	0.47
	EC	0.54	0.69	0.69	0.69	0.72	0.63	0.72	0.86	0.41	0.97	0.67	0.77
Países bajos	no-EC	0.33	0.34	0.36	0.36	0.30	0.29	0.31	0.30	0.34	0.33	0.40	0.37
	EC	0.43	0.45	0.48	0.38	0.35	0.19	0.31	0.27	0.21	0.23	0.40	0.36
Italia	no-EC	1.51	1.25	1.93	2.08	2.05	2.09	2.18	1.77	2.04	1.81	1.24	1.48
	EC	1.08	0.97	1.99	2.0	2.20	2.66	2.19	1.59	2.09	2.38	1.47	1.38
Hungría	no-EC	1.19	1.40	1.37	1.67	1.90	1.33	1.45	1.56	1.38	1.49	1.46	1.52
	EC	1.46	1.84	1.05	1.47	1.92	1.21	1.31	1.24	1.33	1.60	1.23	1.55

Anexo VI (continuación). Ingesta media diaria de gluten de los diferentes productos, por mes, por país, y por casos diagnosticados de enfermedad celiaca (EC) y casos sanos (no-EC)

	CEREALES INFANTILES (g/día)												
	Casos	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	no-EC	1.55	1.64	1.59	1.68	1.45	1.44	1.16	1.10	0.77	0.60	0.48	0.35
	EC	1.63	1.75	1.64	1.92	1.79	1.58	1.49	1.52	0.94	0.81	0.92	0.50
Países bajos	no-EC	1.31	1.44	1.58	1.39	1.18	1.07	0.83	0.57	0.46	0.52	0.36	0.34
	EC	1.36	1.68	2.09	1.74	1.39	1.04	0.83	0.65	0.65	0.67	0.49	0.49
Italia	no-EC	0.08	0.05	0.00	0.08	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
	EC	0.06	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Hungría	no-EC	1.16	1.37	0.86	0.83	0.83	0.63	0.65	0.65	0.51	0.46	0.44	0.47
	EC	1.32	1.47	0.98	0.97	1.11	0.51	0.72	0.62	0.81	0.46	0.40	0.67

Anexo VI (continuación). Ingesta media diaria de gluten de los diferentes productos, por mes, por país, y por casos diagnosticados de enfermedad celiaca (EC) y casos sanos (no-EC)

	BOLLERÍA (g/día)												
	Casos	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	no-EC	0.00	0.03	0.06	0.08	0.13	0.16	0.16	0.19	0.20	0.21	0.26	0.26
	EC	0	0.01	0.05	0.06	0.14	0.27	0.325	0.39	0.42	0.35	0.2	0.18
Países bajos	no-EC	0.03	0.08	0.13	0.18	0.20	0.24	0.19	0.25	0.24	0.24	0.23	0.28
	EC	0.03	0.09	0.10	0.15	0.19	0.19	0.13	0.19	0.21	0.18	0.23	0.20
Italia	no-EC	0.26	0.34	0.65	0.58	0.76	0.79	0.71	1.30	1.18	1.27	0.74	1.40
	EC	0.24	0.22	0.44	0.65	0.86	0.52	0.75	0.99	1.12	1.15	0.66	1.30
Hungría	no-EC	0.25	0.43	0.75	1.15	1.40	1.42	1.67	1.71	1.88	2.00	2.03	2.10
	EC	0.23	0.31	0.72	1.05	1.23	1.45	1.71	1.72	1.97	1.92	1.83	1.97

Anexo VI (continuación). Ingesta media diaria de gluten de los diferentes productos, por mes, por país, y por casos diagnosticados de enfermedad celiaca (EC) y casos sanos (no-EC)

	OTROS (g/día)												
	Casos	11 m	12 m	14 m	16 m	18 m	20 m	22 m	24 m	28 m	30 m	34 m	36 m
España	no-EC	0.17	0.25	0.26	0.26	0.27	0.26	0.28	0.30	0.37	0.37	0.47	0.53
	EC	0	0.03	0.21	0.14	0.34	0.20	0.18	0.36	0.48	0.71	0.69	0.56
Países bajos	no-EC	0.33	0.48	0.54	0.59	0.78	0.80	0.86	0.83	0.98	0.88	0.97	1.04
	EC	0.27	0.41	0.62	0.62	0.82	0.75	0.73	0.75	0.66	0.65	0.71	0.76
Italia	no-EC	0.02	0.17	0.26	0.24	0.62	0.61	0.67	0.95	1.14	1.13	0.72	1.23
	EC	0.01	0.17	0.20	0.27	0.62	0.63	0.66	0.89	1.10	1.03	0.76	1.10
Hungría	no-EC	0.03	0.05	0.08	0.12	0.18	0.15	0.20	0.25	0.24	0.27	0.30	0.33
	EC	0.02	0.05	0.09	0.13	0.17	0.14	0.20	0.23	0.23	0.24	0.32	0.30

Anexo VII. Características de los casos diagnosticados de enfermedad celiaca en la subcohorte Española.

Casos*	Grupo HLA†	Grupo de intervención	Género*	Edad primera serología positiva (meses)	Edad realización biopsia (meses)	Diarrea#	Otros síntomas digestivos\$	Otros Síntomas / signos	Clasificación Marsh
M1	Grupo 1	Placebo	F	36	38	--	--	NS ^x	3A
M2	Grupo 1	Gluten	F	22	24	--	--	Déficit de hierro	3B
M3	Grupo 3	Placebo	F	12	14	SI	NO		3C
M4	Grupo 3	Placebo	M	18	20	SI	NO		3A
V1	Grupo 3	Gluten	F	18	21	SI	NO		3A
V2	Grupo 1	Gluten	M	18	23	SI	NO		3A
V3	Grupo 3	Placebo	M	60	63	--	--	NS ^x	3B
V4	Grupo 3	Gluten	F	24	27	SI	NO		3B
V5	Grupo 2	Placebo	M	48	52	NO	SI		3A
V6	Grupo 3	Gluten	F	47	49	NO	NO	NS ^x	3B
R1	Grupo 3	Placebo	M	82	84	NO	SI		3A
R2	Grupo 1	Gluten	F	20	23	SI	NO		3C
R3	Grupo 1	Gluten	F	24	26	SI	NO		3B
R4	Grupo 1	Placebo	F	24	26	SI	NO		3A
R5	Grupo 1	Gluten	F	43	47	SI	NO		3B

*Casos: M, casos diagnosticados en Madrid; V, casos diagnosticados en Valencia; R, casos diagnosticados en Reus. †Genotipo HLA, Grupo 1 incluye DQ2.5/DQ2.5 y DQ2.5/DQ2.2; grupo 2 DQ2.2/DQ7; grupo 3 DQ2.5/DQ7, DQ2.5/DQ8, y DQ2.5/X; grupo 4 DQ2.2/DQ2.2, DQ2.2/DQ8 y DQ8/DQ8; y grupo5 DQ2.2/X, DQ8/DQ7 y DQ8/X. **Género: F, femenino; M, masculino. #Diarrea: todos los casos con diarrea presentaron además, o distensión abdominal y/o dolor abdominal y/o vómitos. \$ Otros síntomas digestivos fueron estreñimiento junto con dolor abdominal y/o anorexia. ^x Estos casos no presentaron ninguna sintomatología.

Anexo VII (continuación). Características de los casos diagnosticados de enfermedad celiaca en la subcohorte Española.

Casos*	Grupo HLA†	Grupo de intervención	Género*	Primera serología positiva (meses)	Edad realización biopsia (meses)	Diarrea#	Otros síntomas digestivos\$	Otros síntomas	Clasificación Marsh
R6	Grupo 1	Gluten	F	21	23	SI	NO		3C
R7	Grupo 1	Placebo	M	26	30	SI	NO		3B
R8	Grupo 3	Placebo	M	18	22	SI	NO		3B
R9	Grupo 1	Gluten	F	24	26	--	--	NS ^x	3C
R10	Grupo 1	Gluten	F	26	28	SI	NO		3C
R11	Grupo 1	Gluten	F	16	18	NO	SI		3C
R12	Grupo 2	Gluten	F	24	27	NO	SI		3A
R13	Grupo 3	Gluten	F	25	27	NO	SI		3A
R14	Grupo 1	Gluten	M	21	23	SI	NO		3B
R15	Grupo 3	Gluten	F	25	28	SI	NO		3B
R16	Grupo 3	Placebo	F	94	96	SI	NO		3A

*Casos: M, casos diagnosticados en Madrid; V, casos diagnosticados en Valencia; R, casos diagnosticados en Reus. †Genotipo HLA, Grupo 1 incluye DQ2.5/DQ2.5 y DQ2.5/DQ2.2; grupo 2 DQ2.2/DQ7; grupo 3 DQ2.5/DQ7, DQ2.5/DQ8, y DQ2.5/X; grupo 4 DQ2.2/DQ2.2, DQ2.2/DQ8 y DQ8/DQ8; y grupo5 DQ2.2/X, DQ8/DQ7 y DQ8/X. **Género: F, femenino; M, masculino. #Diarrea: todos los casos con diarrea presentaron además, o distensión abdominal y/o dolor abdominal y/o vómitos. \$ Otros síntomas digestivos fueron estreñimiento junto con dolor abdominal y/o anorexia. ^x Estos casos no presentaron ninguna sintomatología.