

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA

DOTTORATO IN SCIENZE PEDIATRICHE – XXII CICLO

Coordinatore: Prof. Giovanni Sorge

TESI DI DOTTORATO

CLINICO-SPERIMENTALE

Epoca di introduzione del glutine e rischio di malattia
celiaca: trial clinico multicentrico, prospettico,
randomizzato in lattanti ad alto rischio di malattia.

Risultati preliminari

Tutor:

Chiar.mo Prof. Mario La Rosa

Dottoranda:

Dr.ssa Maria Elena Lionetti

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

1. LA MALATTIA CELIACA.....	2
1.1 DEFINIZIONE	3
1.2 EPIDEMIOLOGIA	3
1.3 PATOGENESI	4
1.4 PRESENTAZIONE CLINICA	7
1.5 DIAGNOSI	16
1.6 TERAPIA	18
2. NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE DELLA MALATTIA CELIACA	20
2.1 INTRODUZIONE	21
2.2 TERAPIE ENZIMATICHE	21
2.3 INGEGNERIA GENETICA DEI GRANI	22
2.4 STRATEGIE IMMUNOMODULATORIE.....	23
2.5 CORREZIONE DEL DIFETTO DI BARRIERA INTESTINALE	24
3. PREVENZIONE DELLA MALATTIA CELIACA	27
3.1 INTRODUZIONE	28
3.2 RUOLO DELL'ALLATTAMENTO MATERNO	29
3.3 RUOLO DELL'EPOCA DI INTRODUZIONE DEL GLUTINE NELLA DIETA	31
3.3 RUOLO DELLA QUANTITÀ DI GLUTINE NELLA DIETA	33
3. SCOPO DELLO STUDIO.....	35
4. PAZIENTI E METODI	37
4.1 DISEGNO DELLO STUDIO	38
4.2 VALUTAZIONE DIETETICA	38
4.3 SCREENING PER LA MALATTIA CELIACA.....	39
4.4 ANALISI GENOTIPICA	39
4.5 DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA	40
4.6 ANALISI STASTICA	40
5. RISULTATI PRELIMINARI.....	42
5.1 POPOLAZIONE DELLO STUDIO	43
5.2 SIEROLOGIA ED EPOCA DI INTRODUZIONE DEL GLUTINE.....	44
5.3 INCIDENZA DI MALATTIA CELIACA ED EPOCA DI INTRODUZIONE DEL GLUTINE	44
5.4 INCIDENZA DI MALATTIA CELIACA E ALLATTAMENTO MATERNO	45
6. DISCUSSIONE	46
7. TABELLE.....	51
8. ICONOGRAFIA.....	56
9. BIBLIOGRAFIA	66

1. LA MALATTIA CELIACA

1.1 Definizione

La malattia celiaca, o intolleranza al glutine, è un'enteropatia autoimmune geneticamente determinata, caratterizzata da una risposta immune T-cellulare inappropriata rivolta contro un fattore ambientale, il glutine. Il glutine è un complesso proteico contenuto nel frumento e in altri cereali (farro, segale orzo, spelta, kamut, triticale etc.). La prolamina è una delle frazioni proteiche che costituiscono il glutine ed è la responsabile dell'effetto tossico per il celiaco. La prolamina del frumento è denominata gliadina. Nel soggetto geneticamente predisposto, l'introduzione di alimenti contenenti il glutine determina una reazione immunitaria abnorme nella lamina propria della mucosa del duodeno, reversibile con l'eliminazione del glutine dalla dieta e recidivante con la sua reintroduzione.¹

1.2 Epidemiologia

L'intolleranza al glutine è una delle patologie permanenti più frequenti in assoluto. In Italia la prevalenza è di 1 caso ogni 100 e colpisce lo 0.5-1% della popolazione generale, sia in Europa che in altre aree del mondo (Nord e Sud America, Australia, Africa del Nord, Medio Oriente e parte del continente asiatico).² In generale comunque la malattia colpisce maggiormente la razza bianca e le donne con un rapporto F/M di 2:1. La frequenza di malattia è maggiore in alcuni gruppi di

popolazione, definiti “a rischio”, quali i familiari di primo grado di pazienti celiaci (10-20%), i pazienti affetti da altre patologie di tipo autoimmune come il diabete di tipo I o la tiroidite di Hashimoto (5-10%) e i soggetti con patologie genetiche quali la sindrome di Down (10%), il deficit di IgA e la sindrome di Turner.²

La maggior parte dei dati della letteratura non riporta tassi di prevalenza sensibilmente discordanti tra loro; tuttavia quasi tutti gli studi pongono l'accento sul carattere silente della malattia, spesso non diagnosticata o individuata tardivamente, alludendo alla possibile sottostima del tasso di prevalenza.

Infatti, la malattia celiaca è estremamente proteiforme: il paziente può presentarsi asintomatico, con sintomi gastrointestinali, o con sintomi extra-intestinali. Spesso la presentazione clinica della malattia celiaca viene paragonata ad un iceberg, il cosiddetto “iceberg celiaco”, ad indicare che solo una porzione dei casi di celiachia viene attualmente diagnosticata e trattata, mentre una buona parte è sommersa e non viene riconosciuta, per il fatto che i sintomi di presentazione possono essere atipici, molto sfumati o assenti.

1.3 Patogenesi

La celiachia è una malattia multifattoriale, derivata da una complessa interazione tra patrimonio genetico, fattori immunologici e ambientali.

Per quanto riguarda il substrato genetico, i geni coinvolti sono rappresentati dal complesso maggiore di istocompatibilità, in particolare dal sistema HLA di classe I e

II: circa il 90% dei celiaci risulta HLA-DQ2 positivo (DQA1*0501/DQB1*0201), il 5% è HLADQ8 positivo (DQA1*0301/DQB1*0302); i restanti casi possiedono almeno una delle due componenti dell'eterodimero DQ2 (più spesso il DQB1*0201).³

La tipizzazione HLA ha un alto valore predittivo negativo; ne risulta che la totale assenza dei suddetti genotipi esclude la possibilità di sviluppo della malattia.³

Per quanto riguarda i fattori immunologici, nel determinismo della malattia partecipa la risposta specifica: gli anticorpi IgA antiendomizio (EMA), il cui bersaglio auto-antigenico è la transglutaminasi tissutale (tTg), e i linfociti T soppressori intraepiteliali (IEL) che mostrano un'abnorme attivazione.⁴⁻⁸ La componente ambientale è rappresentata in primo luogo dalla quantità e dalla "qualità" del glutine introdotto con gli alimenti, ma anche dalla durata dell'allattamento al seno, dall'epoca di introduzione di glutine con il divezzamento e dalle infezioni intestinali. La reazione immunitaria responsabile della malattia, avviene in seguito al superamento da parte della gliadina dell'epitelio intestinale, fino a raggiungere la lamina propria. In condizioni fisiologiche la presenza di giunzioni strette (tight junctions) intercellulari rende l'epitelio intestinale impermeabile al passaggio di macromolecole come il glutine, perciò solo minime quantità di frazioni antigeniche superano la barriera epiteliale. Nei soggetti con malattia celiaca l'integrità delle tight junctions, e quindi la permeabilità dell'epitelio intestinale, risulta alterata, determinando quindi un maggiore assorbimento di macromolecole e di glutine. Una

volta giunta nella lamina propria, la gliadina interagisce con la tTG, un enzima che catalizza una reazione di deamidazione di uno specifico residuo glutammico, convertendo la glutammina in acido glutammico, carico negativamente e una reazione di crosslinking, responsabile della genesi di un complesso transglutaminasi-gliadina deamidata. La gliadina deamidata viene così processata dalle cellule presentanti l'antigene (APC) quali le cellule dendritiche, localizzate nella mucosa intestinale, e presentata ai linfociti T CD4+ mediante le molecole HLA DQ2/8. Ciò determina l'attivazione dei linfociti T che secernono una serie di citochine che orientano la risposta immunitaria o verso la produzione di anticorpi (risposta Th2), o verso la flogosi e il rimodellamento tissutale (risposta Th1) (**Figura 1**). In particolare la reazione Th2 stimola l'espansione di cloni di cellule B autoreattive e quindi la produzione di autoanticorpi diretti contro la gliadina, la tTG e i complessi tTG-gliadina deamidata. La risposta Th1, in cui ha un ruolo centrale il Tumor Necrosis Factor stimola invece la secrezione da parte dei fibroblasti intestinali di proteine che determinano il rimodellamento tissutale. Il danno causato dall'infiammazione determina il rilascio di tTG intracellulare, con ulteriore modificazione dei peptidi della gliadina. L'attivazione delle cellule dendritiche da parte dei peptidi del glutine determina l'up-regulation di NKG2D e MICA sui linfociti intraepiteliali (IEL) e sugli enterociti, e l'aumento della permeabilità intestinale a livello delle giunzioni intercellulari (mediato da un incremento dell'espressione intracellulare di zonulina molecola che regola la polimerizzazione

dei microfilamenti di actina e l'apertura delle giunzioni strette), con ulteriore passaggio di macromolecole.⁴⁻⁸ Entrambi questi ultimi due eventi garantiscono una auto-alimentazione del processo.

La **Figura 1** rappresenta la cascata immunitaria della malattia celiaca.

1.4 Presentazione clinica

La malattia celiaca può presentarsi, come sopra accennato, con un ampio spettro di manifestazioni cliniche che vanno da segni e sintomi di un franco malassorbimento a quadri più subdoli e sfumati (**Tabella 1**).

In base alla modalità di presentazione clinica e alle alterazioni istologiche ed immunologiche al momento della diagnosi sono state a lungo riconosciute quattro forme cliniche della malattia celiaca: classica (o tipica), atipica, silente e latente o potenziale. Questa classificazione è stata recentemente modificata ed è stata introdotta una nomenclatura più semplice e chiara con cui si distinguono tre modalità di presentazione clinica della malattia: 1) malattia celiaca maggiore, 2) malattia celiaca minore e 3) malattia celiaca silente e latente.⁸

Malattia celiaca maggiore

L'esordio della sintomatologia si verifica in genere tra i 6 e i 24 mesi di età, ma può presentarsi in qualsiasi epoca di vita. Questa forma è caratterizzata da sintomi tipici di malassorbimento, quali diarrea, steatorrea e calo ponderale, inappetenza e distensione addominale. Altri sintomi frequentemente associati sono l'irritabilità e il

vomito. All'esame obiettivo è presente pallore, addome globoso, pannicolo adiposo scarsamente rappresentato e ipotrofia muscolare (**Figura 2**). Gli esami di laboratorio mostrano i possibili segni del malassorbimento rappresentati da anemia sideropenica, ipoalbuminemia, ipocalcemia e deficit di vitamine. Agli inizi del secolo veniva descritta anche la cosiddetta "crisi celiaca", caratterizzata da diarrea acquosa esplosiva, marcata distensione addominale, severa ipoprotidemia, disidratazione, squilibrio idro-elettrolitico e letargia, condizione che invece attualmente risulta essere estremamente rara.⁹

In questa forma i tests sierologici sono positivi e c'è il tipico coinvolgimento del duodeno e del digiuno prossimale, responsabile del malassorbimento, ma l'estensione del danno mucosale è estremamente variabile.

Malattia celiaca minore

Negli ultimi anni è stata descritta una tendenza generale all'esordio più tardivo della sintomatologia della malattia celiaca. In questa forma, ad esordio più tardivo rispetto la precedente, non sono presenti chiari segni di malassorbimento, ma piuttosto manifestazioni extra-intestinali e/o vaghi disturbi intestinali, quali dolori addominali ricorrenti, nausea, vomito, gonfiore o stipsi.⁹

Anche in questa forma i tests sierologici sono positivi e all'esame istologico delle biopsie duodenali è presente il tipico danno mucosale rappresentato dalla atrofia dei villi, tuttavia poiché il duodeno presenta notevoli riserve funzionali molti individui possono non avere sintomi o segni clinici di malassorbimento.

Numerosi organi e apparati possono essere interessati, isolati o in associazione tra loro. Riportiamo di seguito tutti i possibili distretti coinvolti dalla malattia celiaca minore.

Cute: La dermatite erpetiforme è attualmente considerata come la variante cutanea della malattia celiaca e si osserva nel 15%-25% dei soggetti celiaci. È una malattia caratterizzata da lesioni papulo-vescicolose, pruriginose, simmetricamente localizzate a gomiti, ginocchia e solco intergluteo (**Figura 3**). Patognomonicamente sono i depositi granulari di IgA nelle papille del derma interessato. La dermatite e il danno istologico regrediscono con la dieta priva di glutine (GFD) e ricompaiono a dieta libera. La risoluzione delle lesioni cutanee potrebbe essere lenta e in alcuni pazienti si osserva la completa scomparsa della dermatite dopo 1-2 anni dall'inizio della dieta.¹

Apparato osteoarticolare: Numerosi studi clinici ed epidemiologici hanno riportato l'associazione tra malattia celiaca e osteoporosi. La GFD iniziata in età pediatrica è l'unica misura efficace per ottenere la normalizzazione della densità ossea, mentre nell'età adulta la densità della massa ossea, pur migliorando in corso di dieta, difficilmente si normalizza, con un conseguente rischio elevato di fratture negli adulti affetti da malattia celiaca. Questa evidenza sottolinea la necessità di una diagnosi precoce di malattia celiaca. Lo studio della densità ossea in tutti i pazienti alla diagnosi non sembra essere giustificato in considerazione della bassa prevalenza di osteoporosi osservata in un recente studio su una popolazione di pazienti celiaci

non ancora in trattamento dietetico; la densitometria potrebbe essere riservata ai pazienti con malattia celiaca maggiore soprattutto se presentano pregresse fratture patologiche, ipogonadismo, concomitante intolleranza al lattosio, scarsa compliance o scarsa risposta alla dieta. Dato che il miglioramento della densità ossea si osserva dopo 1-2 anni di dieta senza glutine, è considerato questo il momento migliore per effettuare la densitometria per valutare la necessità di una supplementazione con calcio e vitamina D.⁸

La malattia celiaca è stata talora associata ad artralgie, che si risolvono con la sola dieta aglutinata.

Anche la bassa statura può rappresentare l'unico segno clinico della malattia celiaca. In una recente revisione della letteratura è stata infatti calcolata una prevalenza di malattia celiaca in pazienti con bassa statura del 2,9%-8,3% e la malattia celiaca rappresenta la causa più comune di bassa statura rispetto ad altre patologie organiche e allo stesso deficit di ormone della crescita. La patogenesi della bassa statura nella malattia celiaca non è del tutto chiara. L'alterato rilascio ipofisario dell'ormone della crescita potrebbe essere una conseguenza del malassorbimento (in particolare di zinco, che influenza il rilascio dell'ormone della crescita) oppure potrebbe essere correlata all'azione di peptidi del glutine circolanti nel sistema nervoso centrale o ad un anomalo metabolismo cerebrale di monoammine. Dopo l'inizio della dieta senza glutine si osserva un tipico scatto di crescita ed in genere il target dell'altezza viene raggiunto in 2-3 anni.¹⁰

Sangue: la sideropenia, con o senza anemia, scarsamente responsiva alla terapia marziale per via orale, può spesso rappresentare l'unico segno della malattia celiaca, a causa del coinvolgimento del duodeno prossimale, dove avviene l'assorbimento del ferro. Nel 10% dei celiaci alla diagnosi è presente anemia sideropenica.¹¹

Cavo orale: La cavità orale, parte del sistema gastroenterico, può essere interessata da numerose anomalie nei pazienti con malattia celiaca; tra le più comuni sono riportate la stomatite aftosa ricorrente e l'ipoplasia dello smalto dentale, ma sono state osservate anche forme aspecifiche di glossite atrofica, manifestazioni orali di dermatite erpetiforme, sindrome di Sjogren e lichen planus orale.¹²

Sistema nervoso centrale e periferico: È stato recentemente ipotizzato un coinvolgimento del sistema nervoso centrale e periferico in corso di malattia celiaca, ma la letteratura al riguardo è piuttosto controversa. La spiegazione eziopatogenetica risiede nel malassorbimento di alcune vitamine neurotrope (vitamina E, vitamina B12) o nella produzione di anticorpi diretti contro alcune strutture cerebrali per un meccanismo di mimetismo molecolare. Nell'adulto sono state riportate elevate figure di prevalenza di malattia celiaca in pazienti epilettici e viceversa ed è stata descritta una sindrome caratterizzata da epilessia, calcificazioni occipitali endocraniche e malattia celiaca. L'inizio della dieta senza glutine può ridurre la frequenza delle crisi e il dosaggio dei farmaci anti-epilettici. In età pediatrica una meta-analisi degli studi effettuati non sembra supportare l'ipotesi di un'associazione tra malattia celiaca ed epilessia. L'atassia cerebellare è stata descritta come possibile

manifestazione clinica della malattia celiaca; sono stati riscontrati anticorpi circolanti contro le cellule cerebrali del Purkinje e la cross-reattività con gli anticorpi anti-gliadina e con gli enterociti suggerisce una comunanza di epitopi. Tuttavia, in molti casi si tratta di una sensibilità al glutine, dimostrata dalla presenza di anticorpi anti-gliadina IgG, non patognomoni di malattia celiaca, in assenza di un danno intestinale. In età pediatrica, secondo un largo studio prospettico di popolazione su 835 bambini celiaci il rischio di atassia cerebellare è nullo e nessuno dei 49 bambini con atassia (sia di origine nota che idiopatica) è risultato positivo allo screening per la malattia celiaca. La diversa prevalenza osservata nell'adulto rispetto al bambino potrebbe essere ricondotta alla minore durata di malattia in età pediatrica che potrebbe non essere sufficiente per determinare il danno neurologico. Recentemente sono state descritte nei pazienti celiaci delle lesioni a carico della sostanza bianca visualizzate tramite risonanza magnetica cerebrale localizzate in sede biparietale-occipitale, uniparietale, frontale e uniparieto-occipitale, ma il valore prognostico di queste lesioni non è noto e dovrebbe essere chiarito con ulteriori studi.

Il coinvolgimento del sistema nervoso periferico è da ricondurre a poliradiculoneuropatie periferiche monofasiche e/o ricorrenti; la forma più comune è una neuropatia cronica, simmetrica, sensoriale, anche se sono state descritte forme motorie e autonome. Sono stati riscontrati anticorpi anti-ganglioside, suggerendo l'ipotesi di una reazione immune contro antigeni dei nervi periferici. La letteratura pediatrica sembrerebbe supportare questa possibile associazione e la dieta senza

glutine potrebbe avrebbe un ruolo importante considerando la regressione dei sintomi in corso di dieta e la loro ricomparsa in occasione di accidentali assunzioni di glutine.

La patologia neurologica più comunemente associata alla malattia celiaca sia nell'adulto che nel bambino è la cefalea. Recentemente, è stata osservata una prevalenza di cefalea nei bambini celiaci del 25% rispetto all'8% in un gruppo controllo di bambini sani; la dieta senza glutine portava ad un miglioramento della cefalea in più del 75% dei casi e la persistenza della sintomatologia era suggestiva di una scarsa compliance dietetica, supportando l'ipotesi di un disturbo glutine-correlato. In aggiunta, è stata riscontrata una prevalenza di malattia celiaca in bambini affetti da cefalea pari al 5%, significativamente più alta rispetto alla popolazione generale. Questo dato potrebbe essere di notevole interesse clinico in quanto al momento i tests per la malattia celiaca non sono inclusi tra le indagini da effettuare in presenza di cefalea e dunque alcuni di casi di celiachia potrebbero rimanere non diagnosticati e i pazienti affetti da cefalea continuerebbero a non trovare una soluzione al loro disturbo.

Sono state descritte recentemente altre manifestazioni neurologiche in associazione alla malattia celiaca quali ipotonia, disturbi del comportamento, ritardo mentale o la sindrome da iperattività-deficit d'attenzione. Tra i disturbi del comportamento in ambito pediatrico l'autismo è una delle associazioni più studiate. Tuttavia, la letteratura al riguardo al momento sembra escludere una forte associazione tra

malattia celiaca e autismo e sottolinea la necessità di larghi studi, sistematici, multicentrici per stabilire il ruolo reale del glutine in questo contesto.¹³

Altri sintomi extraintestinali: ipertransaminasemia, cardiomiopatia dilatativa e miocardite autoimmune, ritardo della pubertà, infertilità e abortività ricorrente sono tutte condizioni che possono celare una malattia celiaca.⁸

Malattia celiaca silente e latente

La malattia celiaca si definisce silente in soggetti asintomatici che presentano i tests sierologici positivi e l'atrofia dei villi all'esame istologico delle biopsie duodenali. Si tratta, in genere, di familiari di pazienti celiaci che eseguono lo screening per la malattia celiaca, o di soggetti che effettuano l'endoscopia per altri motivi.⁹ Tuttavia, spesso una più accurata anamnesi clinica di questi casi silenti rivela la presenza di un basso grado di malattia spesso associato ad uno stato di malessere psicologico. Di comune riscontro sono la sideropenia, con o senza anemia, disturbi del comportamento, quali tendenza alla depressione, irritabilità, o scarsa performance scolastica nei bambini, facile affaticabilità e ridotta densità minerale ossea. Uno studio che ha valutato adolescenti con malattia celiaca diagnosticata tramite screening e apparentemente asintomatici alla diagnosi, dimostrava dopo un anno di follow-up un miglioramento delle condizioni fisiche e psicologiche seguendo una stretta dieta senza glutine.

Esiste anche una forma di malattia celiaca definita latente o potenziale in presenza di tests sierologici positivi, un genotipo HLA predisponente (DQ2 o DQ8), ma con

una mucosa intestinale normale o con minime alterazioni dell'architettura (conta intraepiteliale aumentata) (Tabella 2). Questi soggetti non sono considerati celiaci e non devono seguire una dieta senza glutine, ma nel tempo potrebbero sviluppare sintomi e alterazioni istologiche intestinali per cui devono essere seguiti nel tempo.⁹

Malattie associate

Nell'ambito della presentazione clinica della malattia celiaca uno degli argomenti più dibattuti è l'associazione con altre malattie autoimmuni. Sono due le teorie più accreditate: 1) la presenza di un insieme di geni che predispone ai fenomeni autoimmunitari in genere, per cui è più facile un'associazione di più malattie autoimmunitarie oppure, 2) la malattia celiaca favorisce l'esordio di altre malattie autoimmuni in soggetti geneticamente predisposti. Il possibile ruolo preventivo del trattamento precoce della malattia celiaca sullo sviluppo delle complicanze autoimmuni è una questione ancora dibattuta. È stato dimostrato che ritardare la diagnosi, e quindi aumentare il tempo di esposizione al glutine in bambini celiaci non a dieta senza glutine, comporta una più alta prevalenza di anticorpi organo-specifici (apparentemente glutine-dipendenti) che tendono a scomparire dopo l'inizio del trattamento. Questi dati suggeriscono l'ipotesi che la dieta senza glutine iniziata precocemente possa prevenire le altre malattie autoimmuni. D'altro canto, altri studi hanno riportato recentemente che la durata di esposizione al glutine in adulti celiaci non correla con il rischio di malattie autoimmuni.

La forte associazione con la tiroidite autoimmune è confermata da uno studio che ha riscontrato una prevalenza di malattia celiaca del 7,8% in bambini con tiroidite autoimmune od ipertiroidismo. La prevalenza media di malattia celiaca nel diabete mellito di tipo I riscontrata nei 26 studi effettuati è del 4,5% (0.97–16.4%).

Infine la malattia celiaca può associarsi a cromosomopatie (Sindrome di Turner, Sindrome di Down) ed a malattie geneticamente determinate (Deficit assoluto di IgA, Sindrome di Williams).⁹

1.5 Diagnosi

Il gold standard per la diagnosi di malattia celiaca è la biopsia duodenale, in grado di dimostrare la presenza delle caratteristiche alterazioni.¹⁴ Il danno istologico a livello del piccolo intestino si caratterizza per un sovvertimento architeturale dei villi associato a iperplasia delle cripte, infiltrato infiammatorio a livello della lamina propria costituito prevalentemente da plasmacellule e aumento dei IEL. La sequenza delle lesioni che intervengono nella progressione del danno alla mucosa intestinale è stata descritta da Marsh.¹⁵ La classificazione di Marsh identifica tre distinte entità: tipo 1 (o infiltrativa): villi normali ma incremento patologico del numero dei linfociti intraepiteliali (> 25/100 cellule epiteliali); tipo 2 (o iperplastica), in cui all'incremento del numero dei linfociti intraepiteliali si associa anche un'iperplasia delle cripte ghiandolari; tipo 3 (o distruttiva) in cui all'incremento del numero dei linfociti intraepiteliali ed alla iperplasia delle cripte ghiandolari, si associa un'atrofia dei villi di

grado variabile. Oberhuber et al. hanno proposto una modifica alla classificazione di Marsh proponendo che la lesione di tipo 3 o distruttiva venga ulteriormente suddivisa in tre sottogruppi, in base all'entità dell'atrofia: 3a con atrofia di grado lieve; 3b con atrofia di grado moderato; 3c con atrofia di grado severo.¹⁶

I test di screening utilizzati per porre diagnosi di celiachia sono: gli anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) di classe IgA e IgG, gli anti-endomisio (EMA) di classe IgA, e gli anticorpi antigliadina (AGA) di classe IgA e IgG. Gli anti-tTG e gli EMA, presentano una sensibilità e specificità diagnostica praticamente sovrapponibili e molto elevate. Gli anti-tTG presentano il vantaggio di essere identificati mediante la tecnica ELISA automatizzata, non operatore dipendente, a differenza della ricerca degli EMA che avviene mediante immunofluorescenza. Inoltre gli anti-tTG sono anticorpi sia di classe IgA che IgG, utili in presenza di deficit di IgA.¹⁷ Esiste inoltre la possibilità di ricercare gli anticorpi anti-peptidi deamidati della gliadina (IgA e IgG) che nei casi di malattia celiaca in soggetti giovanissimi, sono rilevabili ancora più precocemente rispetto agli anti-tTG e agli AGA tradizionale. Specie se di classe IgG sembrano avere sensibilità e specificità simili agli IgA anti-tTG.¹⁸ Nei casi positivi, la diagnosi deve essere tuttavia confermata dalla biopsia intestinale. D'altra parte la biopsia è poco gradita dal paziente e dai suoi familiari, poiché richiede l'esecuzione di una esofagogastroduodenoscopia, esame invasivo, costoso e non del tutto immune da possibili rischi. Questa procedura potrebbe essere omessa senza alcuna perdita di accuratezza diagnostica nei casi in cui sia applicabile la cosiddetta

“regola dei 4/5” cioè in presenza di 4 dei seguenti 5 elementi: enteropatia celiaca, presenza di predisposizione HLA, sintomi tipici, alto titolo di anticorpi, risposta alla GFD. Per contro, la biopsia intestinale rimarrà un’indagine fondamentale nei casi dubbi, situazioni nelle quali l’applicazione di tecniche istologiche avanzate, quali la ricerca mediante immuno-istochimica dei depositi di IgA a livello sub-epiteliale, può addirittura migliorare la resa diagnostica di questa procedura.⁸

1.6 Terapia

L’unico trattamento previsto per la malattia celiaca è una dieta di eliminazione del glutine (GFD).¹⁹ In pratica, devono essere esclusi dall’alimentazione quotidiana tutti gli alimenti contenenti proteine del frumento (kamut, farro, triticale, spelta), dell’orzo, della segale, del bulgur, del couscous, del frik. Al posto dei cereali vietati possono essere introdotti prodotti dieto-terapeutici privi di glutine, contrassegnati col marchio della “spiga barrata” sulla confezione. Non vi sono limitazioni all’uso di alimenti naturalmente privi di glutine, quali cereali: il riso e il mais, o altri alimenti naturali, sia amidacei (patate, castagne, legumi, etc.) che d’altra natura (latte e derivati, frutta, verdura, carne, pesce, etc.). Il trattamento dietetico della malattia celiaca determina la graduale scomparsa dei sintomi, delle alterazioni bioumorali e la normalizzazione del quadro istologico della mucosa intestinale. La GFD deve essere mantenuta per tutta la vita. Tale cura, specie se avviata precocemente in età pediatrica, riduce notevolmente il rischio di complicanze tardive. La GFD

rappresenta un trattamento risolutivo ed efficace, che tuttavia presenta alcune importanti limitazioni che la rendono difficile da rispettare (**Figura 9**). Infatti la necessità di escludere tutti gli alimenti derivati dal frumento comporta, in primo luogo, una notevole restrizione delle scelte alimentari soprattutto in occasione dei pasti consumati fuori casa, poiché la grande maggioranza degli esercizi pubblici (es. mense) e privati (es. bar, pizzerie), non sono preparati a soddisfare le esigenze nutrizionali del soggetto celiaco. Inoltre diversi studi hanno messo in evidenza come la GFD possa risultare carente di alcuni importanti principi alimentari, quali le fibre, il ferro, lo zinco, il magnesio, il calcio e l'acido folico.

Tali deficienze possono, a lungo termine, predisporre allo sviluppo di patologie dismetaboliche quali la stipsi, l'obesità e l'ipercolesterolemia.¹⁹

2. NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

2.1 Introduzione

La combinazione delle difficoltà e dei limiti sopra riportati riguardanti la dieta priva di glutine con i recenti progressi sulle conoscenze della patogenesi della malattia celiaca a livello cellulare e molecolare hanno aperto strade per sviluppare possibili terapie alternative alla dieta.²⁰

2.2 Terapie enzimatiche

È da tempo noto che l'alto contenuto di prolina che caratterizza la gliadina rende questa proteina estremamente resistente alla digestione da parte di enzimi pancreatici e del brush border intestinale. Pertanto è stato proposto l'uso di prolil-endopeptidasi batteriche che sarebbero in grado di digerire completamente la gliadina, distruggendone così gli epitopi tossici riconosciuti dalle cellule T. Quello che rimane da stabilire è se questo supplemento enzimatico in vivo è capace di digerire completamente e, quindi detossificare, peptidi gliadinici particolarmente tossici che sono presenti in grandi quantità nell'intestino prossimale nella fase immediatamente post-prandiale. In alternativa, questi enzimi supplementari batterici potrebbero essere usati per pre-trattare il glutine utilizzato per la preparazione di cibi a base di grani potenzialmente tossici per i celiaci che risulterebbero più economici e palatabili dei prodotti correnti a base di cereali alternativi naturalmente non

contenenti glutine. A tal proposito sono già state utilizzate con successo proteasi isolate da lattobacilli.²¹

2.3 Ingegneria genetica dei grani ed uso di peptide gliadinici inibitori

Programmi di incrocio genetico di grani e/o tecnologia transgeniche potrebbero portare allo sviluppo di frumento in cui le sequenze tossiche della gliadina siano state eliminate. È stato anche proposto anche di generare mutazioni puntiformi del frumento senza cambiarne le sue caratteristiche organolettiche, ma questo approccio è reso difficile dal grosso numero e dalle molte ripetizioni di queste sequenze tossiche. L'identificazione di epitopi specifici potrebbe anche fornirci un bersaglio specifico per l'immunomodulazione di antigeni peptidici. A seconda della natura degli aminoacidi presenti nella posizione che interagisce con specifici recettori delle cellule T, il riconoscimento peptidico potrebbe portare ad un'attivazione cellulare (peptidi agonisti), ignoranza a riconoscere il peptide (peptidi null), o addirittura alla mancata risposta nota anche come anergia (peptidi antagonisti). Ovviamente, le possibilità di successo con l'uso di peptide analoghi per modulare la risposta immunitaria specifica potrebbe essere minata dalla grande eterogeneità degli epitopi gliadinici che interagiscono con le cellule T finora identificati. Pertanto sarà importante studiare la gerarchia degli epitopi gliadinici tossici per poter impostare una terapia mirata basata sull'ingegneria genetica di questi peptidi.²¹

2.4 Strategie immunomodulatorie

L'enzima autoantigene tTG è prevalentemente espresso nella lamina propria intestinale e la sua espressione è aumentata da molti stimoli, inclusi lo stress meccanico ed infezioni batteriche e/o virali, in corso di malattia celiaca attiva. L'enzima catalizza la transamidazione tra un residuo di glutamina di una proteina glutamino-donatrice ed una lisina di una proteina glutamino-accettrice, unendo queste proteine ed aumentandone il loro tasso di fagocitosi da parte di cellule presentanti antigene. Sebbene i dettagli molecolari di questa interazione rimangano elusivi, inibitori selettivi della tTG intestinale potrebbero rappresentare una strategia potenziale per bloccare la risposta immunotossica ai peptidi gliadinici in corso di celiachia. Comunque, l'efficacia di possibili effetti collaterali di un approccio di questo tipo rimangono da stabilirsi. Il ruolo cruciale dell'HLA rende questo bersaglio un altro approccio possibile per interventi terapeutici che blocchino la presentazione peptidica da parte del DQ2 o DQ8. Inoltre altri target di tipo immunomodulatorio, compreso l'IL10 potrebbero rappresentare delle alternative valide per indurre tolleranza. C'è però da tener presente che si cominciano da accumulare evidenze abbastanza solide che la tossicità al glutine non solo dipende da una risposta T-mediata, ma anche dal coinvolgimento di una risposta immunitaria di tipo innato. Pertanto trattamenti con anticorpi anti-IL15 sono stati proposti, soprattutto nella celiachia refrattaria, in considerazione del ruolo di questa citochina nell'attivare i linfociti intraepiteliali. Ciò nonostante, bisogna tener conto del fatto

che una celiachia in remissione è una condizione tutto sommato benigna e che il trattamento dietoterapeutico, per quanto difficile e strenuo, è scevro di effetti collaterali. Pertanto, qualsiasi approccio terapeutico di tipo immunomodulatorio dovrebbe avere un profilo di “safety” quanto meno equivalente a quello della dieta, ma con il vantaggio di una compliance migliore.²¹

2.5 Correzione del difetto di barriera intestinale

Tradizionalmente, le funzioni primarie del tratto gastrointestinale sono state considerate essere limitate alla digestione ed all'assorbimento di nutrienti ed elettroliti ed all'omeostasi dell'acqua. Comunque, un'analisi più attenta dell'organizzazione anatomica e funzionale del tratto gastrointestinale ci suggerisce che la sua funzione barriera e l'abilità di regolare il traffico di macromolecole tra ambiente (lume intestinale) ed ospite (sottomucosa e circolo ematico) sono funzioni altrettanto importanti di quest'organo. In concerto con il tessuto linfoide intestinale ed il network neuroendocrino, la barriera epiteliale intestinale con le sue tight junctions (tj) intercellulari controlla l'equilibrio tra tolleranza e risposta immunitaria verso antigeni non-self. Quando questo traffico di macromolecole controllato così attentamente viene a perdersi in soggetti geneticamente predisposti, si possono sviluppare malattie infiammatorie ed autoimmunitarie che possono colpire sia l'intestino che organi extra-intestinali. Questo nuovo paradigma sovrage le classiche teorie sull'autoimmunità basate sul “molecular mimicry” ed il “bystander

effect”, suggerendo che il processo autoimmunitario potrebbe essere arrestato se si previene l’intergioco tra geni e fattori scatenanti ambientali attraverso un ripristino della funzione barriera intestinale.²⁰ In base a queste evidenze, è possibile ipotizzare che la rimozione di uno qualsiasi dei tre elementi necessari allo sviluppo di immunità (predisposizione genetica, esposizione allo stimolo ambientale, o correzione del difetto di barriera intestinale) potrebbe rappresentare una valida opzione terapeutica. Poiché l’eliminazione dei geni predisponenti non è proponibile e poiché la rimozione dell’antigene scatenante (un’opzione disponibile solo per la celiachia) ha i suoi problemi intrinseci (vedi sopra), la correzione dei difetti di barriera intestinale associato ad un’alterazione del sistema della zonulina potrebbe rappresentare una terapia innovativa alternativa. L’uso del larazotide acetato, un inibitore della zonulina che corregge i difetti di barriera intestinale, è stato già usato con successo in un modello animale di autoimmunità e più recentemente in una serie di trial clinici doppio cieco nell’uomo che ne hanno provato tollerabilità, mancanza di effetti collaterali ed efficacia clinica. Finora più di 300 soggetti sono stati esposti al larazotide acetato senza riportare un aumento di effetti collaterali quando paragonati al gruppo placebo. Circa il 70% di pazienti celiaci in remissioni esposti ad una dose singola di glutine hanno registrato un’umentata permeabilità intestinale, mentre non si sono osservati cambiamenti nei soggetti che avevano ricevuto, oltre al glutine, anche il farmaco 5. In un successivo trial doppio cieco in cui pazienti celiaci in remissione sono stati esposti per 6 settimane a dosi giornaliere di 2,5 g di glutine

hanno riportato un aumento dei sintomi gastrointestinali tipici della celiachia, associati ad un aumento significativo della comparsa di anticorpi anti-tTG ed all'aumento della produzione di citochine infiammatorie, incluso IFN- γ . L'assunzione concomitante di larazotide acetato ha significativamente ridotto la frequenza di sintomi gastrointestinali ed ha prevenuto l'aumento degli anticorpi anti-tTG e della produzione di citochine infiammatorie.²²

3. PREVENZIONE DELLA MALATTIA CELIACA

3.1 Introduzione

La celiachia è una patologia causata dall'interazione di numerosi fattori di predisposizione genetica ed ambientale, questi ultimi rappresentati, per quanto è dato sinora di sapere, dalla quantità e dalla qualità del glutine assunto, dalla tipologia dell'alimentazione in generale, specie nelle prime epoche della vita, e dalle infezioni a livello intestinale. Obiettivo della prevenzione primaria è quello di ridurre il rischio di sviluppare la celiachia attraverso interventi, a livello di popolazione generale o di soggetti a rischio, sui fattori ambientali che favoriscono lo sviluppo di celiachia.

In Italia ed in altri paesi europei il consumo di glutine è molto elevato, pari all'incirca a 10-20 g al giorno per persona. Poiché esiste un rapporto diretto tra la quantità di glutine assunta ed il rischio di sviluppare la celiachia,²³ una possibilità preventiva sarebbe quella di mirare ad una riduzione dei consumi di glutine a livello di tutta la popolazione. Al momento attuale questa strategia appare di difficile attuazione, poiché vi è semmai la tendenza diffusa all'aumento dei consumi dei prodotti ricchi di glutine, quali pasta e pizza, sia nei paesi occidentali che in quelli in via di sviluppo. Un'altra ipotesi riguarda l'impiego, a fini alimentari, di cereali meno "tossici", per quanto riguarda la capacità di indurre celiachia, rispetto a quelli utilizzati attualmente. Come è noto, le varietà di frumento di maggiore consumo sono quello tenero (utilizzato per panificare) e quello duro (utilizzato soprattutto per fare la

pasta). Dati sperimentali recenti suggeriscono che le frazioni più tossiche del glutine, soprattutto il cosiddetto 33-mero (peptide costituito da 33 aminoacidi con notevoli capacità immunogeniche), siano maggiormente rappresentate nel grano tenero, cioè la varietà che da sola costituisce ben il 90% dei consumi globali di grano. Varietà “primordiali” di frumento, quali ad es. esempio il monococco (Einkorn), avrebbero una ridotta capacità di indurre la malattia celiaca poiché contengono una quantità di peptidi tossici notevolmente inferiore rispetto al grano tenero. Non è pertanto fuori luogo ipotizzare che la frequenza della celiachia nella popolazione generale potrebbe diminuire qualora vi fosse una sostituzione, almeno parziale, delle varietà di frumento attuali con altre meno tossiche.²¹ A tal fine è interessante notare come la coltivazione di monococco, pressoché scomparsa nel passato, sta “riemergendo” in Italia ed in altri paesi europei.

Attualmente l'interesse dei ricercatori è focalizzato sui rapporti tra la alimentazione durante le prime epoche della vita ed il rischio di sviluppare celiachia.

3.2 Ruolo dell'allattamento materno

L'effetto protettivo dell'allattamento materno sullo sviluppo delle allergie alimentari è stato ipotizzato da molto tempo. La maggior parte degli studi effettuati sullo specifico effetto protettivo dell'allattamento materno sullo sviluppo della malattia celiaca, sebbene effettuati con metodologie e popolazione selezionate differenti, ha dimostrato una correlazione negativa tra la durata dell'allattamento e lo sviluppo

della malattia celiaca.²⁴⁻²⁶ Una meta-analisi rigorosa ha preso in esame tutti gli studi epidemiologici osservazionali che hanno valutato l'effetto dell'allattamento sullo sviluppo della malattia celiaca e ha riscontrato che i bambini allattati al seno al momento dell'introduzione del glutine nello svezzamento aveva un rischio di sviluppare la malattia celiaca ridotto del 52% rispetto ai bambini non allattati all'epoca dell'introduzione del glutine (OR 0.48; 95% CI: 0.40-0.59).²⁷ Gli stessi autori della metanalisi hanno successivamente valutato quanti casi di malattia celiaca potrebbero essere prevenuti nel Regno Unito dall'allattamento materno e hanno dimostrato che se tutti i bambini fossero allattati al seno al momento dell'introduzione del glutine, questo potrebbe portare alla prevenzione di più di 2500 casi di malattia celiaca per anno.²⁸

L'osservazione dell'esperienza svedese fornisce un altro supporto all'ipotesi del ruolo protettivo dell'allattamento materno. I bambini svedesi che erano allattati al seno al momento dell'introduzione del glutine nella dieta, anche se con elevate quantità, presentavano un rischio più basso di diventare celiaci rispetto ai bambini allattati con latte formulato (OR 0.59; 95% CI: 0.42-0.83) e il rischio era ulteriormente ridotto se proseguivano l'allattamento materno (OR 0.36; 95% CI: 0.26-0.51).²⁹⁻³⁰

In contrasto, i risultati di un recente studio osservazionale (Studio DAISY) della durata di 10 anni effettuato su un gruppo di 1560 bambini ad alto rischio di malattia celiaca o diabete di tipo I (HLA-DQ2 o DQ8 o parenti di primo grado di pazienti

affetti da diabete tipo I) non mostrano alcuna evidenza di un effetto protettivo dell'allattamento materno prolungato.³¹ Gli stessi autori hanno sottolineato questa discrepanza e la attribuiscono alla differente metodologia di studio – il DAISY era uno studio prospettico osservazionale su bambini ad alto rischio di malattia, mentre gli studi precedenti erano tutti retrospettivi ed includevano la popolazione pediatrica generale.³¹

Infine, un recente studio effettuato su 162 bambini mostrava che i bambini celiaci allattati al seno all'epoca di introduzione del glutine presentavano sintomi extra-intestinali ed intestinali, mentre i bambini non allattati al seno presentavano con maggiore probabilità sintomi intestinali.³²

Pertanto, rimangono da chiarire alcuni punti cruciali: a) l'allattamento materno durante la prima esposizione al glutine fornisce un effetto protettivo nei confronti della malattia celiaca o ritarda semplicemente il suo sviluppo? b) i bambini allattati al seno durante l'introduzione del glutine sviluppano prevalentemente forme atipiche di malattia con sintomi extra-intestinali? c) qual è il meccanismo con cui l'allattamento materno protegge dallo sviluppo della malattia celiaca?³³

3.3 Ruolo dell'epoca di introduzione del glutine nella dieta

L'ipotesi attraente che l'età all'epoca dell'introduzione del glutine nello svezzamento possa influenzare lo sviluppo della malattia celiaca deriva dal fatto che in un dato momento dello sviluppo l'uomo sembra perdere la capacità di sviluppare una

tolleranza orale ad nuovi antigeni introdotti con la dieta.³² D'altro canto la precoce introduzione di alimenti solidi (ad esempio prima che il sistema immunitario intestinale raggiunga il livello di maturazione) può portare allo sviluppo di intolleranza.³⁴

In realtà, i risultati degli studi più datati hanno suggerito che l'età all'epoca dello svezzamento potrebbe non avere influenza sullo sviluppo della malattia celiaca, ma solo sulla modalità di presentazione clinica della malattia.³⁵

Una riduzione dell'incidenza di malattia celiaca in seguito ad un cambiamento della modalità di svezzamento fu riportata nella popolazione pediatrica in Inghilterra alla fine degli anni '70.³⁶ Gli autori avevano registrato una riduzione dell'incidenza di malattia celiaca da 1:1228 a 1:4168 in seguito alle nuove raccomandazioni dietetiche che consigliavano di evitare l'introduzione del glutine prima di 4 mesi di vita. Tuttavia, la coorte di bambini considerata in questo studio era limitata e si trattava comunque di un'analisi retrospettiva; inoltre, l'incidenza globale di malattia celiaca riportata sembra marcatamente più bassa rispetto alle attuali conoscenze dell'epidemiologia della malattia.

Successive evidenze epidemiologiche più forti circa il ruolo dell'epoca di introduzione del glutine nello svezzamento derivano dallo studio DAISY precedentemente menzionato che ha valutato l'età al momento della prima introduzione del glutine (prima di 3 mesi, tra 3 e 7 mesi e dopo 7 mesi) in un gruppo di 1560 bambini ad alto rischio di malattia in relazione al successivo sviluppo di

malattia celiaca. I risultati mostravano che su 51 bambini diventati celiaci quelli che erano stati esposti al glutine nei primi 3 mesi di vita avevano un rischio 5 volte più alto di malattia rispetto a coloro che avevano assunto il glutine tra 4 e 6 mesi [Hazard ratio (HR): 5.17; 95% CI: 1.44-18.57]; i bambini che avevano assunto il glutine a 7 mesi o dopo i 7 mesi mostravano solo un lieve aumento dell'hazard ratio rispetto ai bambini esposti al glutine tra 4 e 6 mesi (HR: 1.87; 95% CI:0.97-3.60).³¹ Questi risultati sembrano confermare l'ipotesi di un periodo finestra durante il quale dovrebbe essere introdotto il glutine per minimizzare il rischio di un successivo sviluppo di malattia.³³ Tuttavia non è ancora stato chiarito quale possa essere l'effetto di una introduzione fortemente posticipata dei cereali contenenti glutine, ad es. a partire dai 12 mesi, quando la barriera intestinale è più efficace nell'impedire l'assorbimento dei peptidi potenzialmente "tossici".

3.4 Ruolo della quantità di glutine nella dieta

L'epidemia di malattia celiaca osservata tra i bambini svedesi a metà degli anni '80 suggerisce che la quantità di glutine ingerita durante lo svezzamento può giocare un ruolo nello sviluppo della malattia celiaca. Dopo il 1982, in Svezia si è assistito ad un'epidemia di malattia celiaca tra i bambini di età inferiore ad un anno, con un'incidenza annuale 4 volte superiore (200-240 casi/100000 abitanti per anno), seguita a partire dal 1995 da una riduzione di incidenza rispetto ai dati annuali precedenti (50-60 casi/100000 abitanti per anno).³⁷⁻³⁸ Questo trend non fu osservato

nei paesi vicini (Danimarca e Inghilterra) dove, in contrasto, fu registrata una riduzione dell'incidenza della malattia nello stesso periodo. Questo pattern epidemico è stato successivamente correlato alle nuove linee guida dietetiche (in seguito modificate per questa ragione) che raccomandavano di introdurre il glutine dopo che i bambini erano stati svezzati dal latte e con maggiori quantità di glutine. Successivamente, gli studi di follow-up della stessa coorte di bambini nati durante l'epidemia mostrava che l'aumentato rischio di sviluppare la malattia celiaca proseguiva nel tempo, dato che la prevalenza della malattia nei bambini di 12 anni nati nel periodo dell'epidemia era di circa il 3%.³⁹

Le differenze regionali dell'epidemiologia della malattia celiaca in India supporta l'ipotesi di un ruolo della quantità di glutine sullo sviluppo della malattia. Infatti, è stata riportata un'incidenza di malattia celiaca più elevata nei paesi ad elevato consumo di glutine rispetto ai paesi che utilizzano soprattutto riso come alimento base.⁴⁰

4. SCOPO DELLO STUDIO

Gli scopi del presente studio sono:

- 1) Valutare il ruolo dell'epoca di introduzione del glutine sull'incidenza di malattia celiaca in una larga coorte di lattanti ad alto rischio di malattia (parenti di primo grado di pazienti affetti da malattia celiaca).
- 2) Valutare il ruolo di altri fattori ambientali sullo sviluppo della malattia celiaca (in particolare l'allattamento materno).
- 3) Analizzare il ruolo delle differenti molecole del sistema HLA sullo sviluppo della malattia celiaca.
- 4) Valutare l'effetto del diverso grado di parentela sulla predisposizione alla malattia celiaca.
- 5) Identificare una coorte di bambini ad alto rischio di malattia che potrà essere seguita a lungo termine per valutare la storia naturale della malattia in relazione al pattern nutrizionale.

5. PAZIENTI E METODI

5.1 Disegno dello studio

Il presente studio è un trial clinico multicentrico randomizzato placebo-controllato di intervento nutrizionale che ha coinvolto numerose regioni del territorio italiano (Lombardia, Emilia Romagna, Sicilia, Puglia, Piemonte, Veneto, Liguria, Abruzzo, Marche, Lazio, Toscana, province autonome di Trento, Campania). Sono stati arruolati prospetticamente nel periodo compreso tra Ottobre 2003 e Giugno 2007 tutti i neonati ad alto rischio di malattia celiaca identificati tramite le famiglie afferenti ai principali centri di gastroenterologia pediatrica presenti su tutto il territorio nazionale. Sono stati considerati ad alto rischio di malattia celiaca i neonati familiari di primo grado (fratelli, sorelle, figli, cugini) di pazienti affetti da malattia celiaca. Il trial è stato approvato dal comitato etico dell'università politecnica delle Marche. È stato ottenuto il consenso informato dai genitori dei neonati arruolati. I neonati sono stati randomizzati a introdurre il glutine con lo svezzamento all'età di 4-6 mesi (Gruppo A) o all'età di 12 mesi (Gruppo B). Tutti i neonati sono stati seguiti per un follow-up di 5 anni. La **Figura 4** mostra il diagramma dello studio.

5.2 Valutazione dietetica

All'età di 4, 7, 9 e 12 mesi sono state raccolte tramite intervista telefonica o di persona le notizie cliniche relative alla dieta (allattamento materno o formulato, durata dell'allattamento materno, aderenza al protocollo dietetico, quantità di glutine

somministrata) e allo stato di salute del bambino (infezioni respiratorie, infezioni gastro-intestinali, infezioni delle vie urinarie, accrescimento staturale-ponderale).

5.3 Screening per la malattia celiaca

Tutti i lattanti sono stati sottoposti al prelievo di 10 ml di sangue all'età di 12, 24, 36 mesi e 5 anni. Tutti i campioni sono stati congelati e conservati a -20° e successivamente inviati al Laboratorio di analisi cliniche di Udine dove sono state effettuate le seguenti indagini sierologiche: dosaggio di IgA sieriche, dosaggio di AGA IgA e IgG, EMA, anti-tTG IgA. Il dosaggio delle IgA sieriche è stato effettuato tramite metodica nefelometrica; il dosaggio degli AGA IgA e IgG è stato effettuato tramite metodica ELISA (valori normali <15 U.I.); il dosaggio degli EMA è stato effettuato tramite immunofluorescenza su sezioni congelate di cordone ombelicale umano utilizzato come antigene; il dosaggio degli anti-tTG è stato effettuato con tecnica ELISA utilizzando un kit basato sull'antigene ricombinante umano (Kit Menarini, Firenze, Italia) (valore normale < 20 U.I.)

5.4 Analisi genotipica

All'età di 15 mesi è stata effettuato il prelievo di una goccia di sangue periferico posta su carta assorbente ed inviata al laboratorio di analisi molecolare Diagene di Palermo dove è stata effettuata la tipizzazione molecolare HLA. I pazienti sono stati genotipizzati per le molecole HLA di classe II DRB1, DQA1 e DQB1. La

tipizzazione HLA è stata effettuata mediante Dynal AllSet+ SSP DQ (Bionat, Palermo, Italia).

5.5 Diagnosi di malattia celiaca

La diagnosi di malattia celiaca era sospettata in presenza di concomitante positività di AGA-IgA ed EmA e/o anti-TG o di singola positività di EmA o anti-TG o in caso di deficit di IgA in presenza di positività di AGA IgG e successivamente confermata mediante esame istologico su biopsia intestinale prelevata tramite esofago-gastro-duodenoscopia. Sono state sempre effettuate almeno quattro biopsie intestinali (comprehensive del bulbo duodenale) per ridurre il rischio di difetto di campionamento. La severità dell'interessamento intestinale dal punto di vista istologico è stata classificata secondo la classificazione di Marsh modificata da Oberhuber. È stata posta diagnosi di malattia celiaca in presenza di un grado di Marsh 2 o 3.

5.6 Analisi statistica

Abbiamo paragonato la percentuale di pazienti con AGA IgA, IgG, EMA e tTG positivi al tempo 15, 24, 36 mesi e 5 anni nei due gruppi di studio utilizzando il test di Fisher esatto o il chi-square test, come appropriato. Abbiamo paragonato la percentuale di pazienti affetti da malattia celiaca ai tempi 15, 24, 36 mesi e 5 anni nei due gruppi di studio tramite test chi-quadro. Abbiamo costruito una curva di

Kaplan-Mayer per valutare il rischio di malattia celiaca in relazione all'epoca di introduzione del glutine nella dieta. Le differenze nella curva sono state valutate mediante test di Wilcoxon. È stata effettuata un'analisi multivariata calcolando un hazard ratio per tutte le variabili studiate (età, sesso, familiare affetto, HLA, durata allattamento materno, allattamento materno in corso di introduzione del glutine, età di introduzione del glutine). Abbiamo considerato tutte le differenze come statisticamente significative ad un livello di probabilità del 5%. Abbiamo effettuato l'analisi statistica usando il programma SPSS 16.0 per MAC.

6. RISULTATI PRELIMINARI

6.1 Popolazione dello studio

Di tutte le famiglie invitate a partecipare allo studio il 95% ha aderito. Sono stati arruolati 800 neonati. 96 sono stati persi al follow-up. La nostra popolazione di studio comprende pertanto 704 neonati [348 maschi (49%)], dei quali 384 (55%) sono stati assegnati al Gruppo A e 320 (45%) al Gruppo B. La **Figura 5** mostra il numero di neonati arruolati nelle diverse regioni su tutto il territorio nazionale. Il 37% dei neonati aveva la madre affetta da malattia celiaca, il 31% la sorella, il 20% il fratello, il 7% il padre, l'1.5% il padre e la sorella, l'1.3% la madre e la sorella, l'1% la madre e il fratello, l'1% il padre e il fratello, lo 0.2% più di due germani. Attualmente, tutti i bambini hanno raggiunto il follow-up dei 15 mesi, 613 (87%) hanno raggiunto il follow-up dei 24 mesi, 337 (48%) hanno raggiunto il follow-up dei 36 mesi e 127 (18%) hanno raggiunto il follow-up dei 5 anni. La **Figura 6** mostra la percentuale di bambini allattati al seno alle differenti epoche di controllo. A sette mesi di vita il 45% dei bambini era ancora allattato al seno. Il 45% dei bambini presentava l'HLA DQ2, il 40% presentava una sola catena del DQ2, l'8% presentava il DQ8 e il 7% presentava un HLA non predisponente (**Figura 7**). La **Tabella 2** mostra le caratteristiche demografiche e cliniche dei due gruppi di studio. Com'è evidente, non erano presenti differenze significative tra i due gruppi.

6.2 Sierologia ed epoca di introduzione del glutine

La **Tabella 3** mostra la percentuale di bambini con sierologia positiva alle diverse epoche di controllo nei due gruppi. A 15 mesi 42/538 (7.8%) bambini presentavano gli AGA IgA positivi con una maggiore percentuale nel gruppo A [Gruppo A 29 (9.5%) vs Gruppo B 13 (5.5%); $p < 0.05$]; a 24, 36 mesi e 5 anni non c'era differenza statisticamente significativa tra la percentuale di bambini positivi agli AGA IgA nei 2 gruppi. Non c'era alcuna differenza significativa tra i due gruppi nella percentuale di bambini risultati positivi per gli AGA IgG in tutte le epoche di controllo. A 15 mesi 16/568 (2.8%) bambini erano positivi agli anti-tTG con una maggiore percentuale nel gruppo A [Gruppo A 15 (4.7%) vs Gruppo B 1 (0.4%); $p < 0.02$]. A 24, 36 mesi e 5 anni non c'era differenza statisticamente significativa tra la percentuale di bambini positivi agli anti-tTG nei 2 gruppi.

6.3 Diagnosi di malattia celiaca ed epoca di introduzione del glutine

La **Figura 8** mostra il numero di bambini a cui è stata posta diagnosi di malattia celiaca nei 2 gruppi di studi alle diverse epoche di controllo. A 15 mesi 9/312 bambini del Gruppo A e 1/247 bambino del Gruppo B hanno avuto diagnosi di malattia celiaca, con una differenza statisticamente significativa (2.9% vs 0.4%; $p < 0.02$). A 24 mesi 21/230 bambini del Gruppo A e 10/188 bambini del Gruppo B hanno avuto diagnosi di malattia celiaca, ma la differenza non era statisticamente significativa (9.1% vs 5.3%; $p = \text{NS}$). A 36 mesi 6/151 bambini del Gruppo A e

10/138 bambini del Gruppo B hanno avuto diagnosi di malattia celiaca, senza differenza statisticamente significativa tra i due gruppi (3.9% vs 7.2%; $p=NS$). A 5 anni nessun bambino nei due gruppi è risultato affetto da malattia celiaca. La curva di Kaplan-Mayer mostra che il rischio di sviluppare la malattia celiaca è significativamente maggiore nel Gruppo A rispetto al Gruppo B (**Figura 9**).

6.4 Diagnosi di malattia celiaca e allattamento, HLA, familiare affetto.

La **Tabella 4** mostra i risultati dell'analisi multivariata. La presenza di HLA predisponente chiaramente influenza il rischio di malattia (HR: 5.98; 95% CI: 2.81 - 12.73). L'altra variabile che influenza il rischio di malattia è l'allattamento materno. I bambini allattati al seno in corso di introduzione del glutine nella dieta hanno un rischio significativamente ridotto di sviluppare la malattia celiaca rispetto ai bambini non allattati al seno (HR: 3.0; 95% CI: 0.4 - 5.6). Le altre variabili studiate (sesso, tipo di HLA, familiare affetto, durata allattamento materno) non influenzano in maniera significativa il rischio di malattia.

7. DISCUSSIONE

Il presente studio dimostra la presenza di un'associazione tra epoca di introduzione del glutine nella dieta e sviluppo di malattia celiaca. I risultati preliminari suggeriscono che l'introduzione del glutine tra 4 e 6 mesi aumenta il rischio di malattia celiaca rispetto all'introduzione tardiva dopo 12 mesi.

Nessuno studio in precedenza aveva valutato l'effetto di una introduzione fortemente posticipata dei cereali contenenti glutine, ad es. a partire dai 12 mesi. Lo studio DAISY, un importante studio epidemiologico prospettico su bambini ad alto rischio di malattia, aveva dimostrato che l'introduzione molto precoce di glutine (i.e. prima di 3 mesi) aumentava il rischio di malattia celiaca di 5 volte rispetto all'introduzione tra 4 e 6 mesi.³¹ Il presente studio dimostra che il rischio di malattia può ulteriormente essere ridotto con un'introduzione più tardiva, successiva a 12 mesi.

L'ipotesi per cui l'introduzione precoce del glutine può influenzare il rischio di malattia risiede nell'eziopatogenesi della malattia. È stato dimostrato che la deamidazione della gliadina da parte della tTG favorisce il riconoscimento dei peptidi di gliadina dalle cellule T e questo potrebbe dare inizio alla cascata di reazioni autoimmuni che portano alla malattia celiaca.⁴¹⁻⁴² Perché questo avvenga è necessario che la gliadina riesca ad attraversare la barriera epiteliale intestinale in modo che possa essere riconosciuta dalle cellule presentanti l'antigene. La barriera intestinale funziona da principale organo di difesa contro antigeni esterni, tossine e

macromolecole che raggiungono l'ospite attraverso la via orale. Nelle epoche precoci di vita questa barriera potrebbe non essere completa rispetto ad epoche di vita più tardive, e questo potrebbe consentire alla gliadina di attraversare la barriera intestinale più agevolmente. Inoltre, la recente scoperta che la gliadina può essa stessa attivare il pathway di signaling intracellulare zonulina-dipendente che porta ad un aumento della permeabilità intestinale⁴¹ suggerisce che, una volta entrata la gliadina, si inneschi un circolo vizioso che porta ad un aumento della permeabilità intestinale tramite l'attivazione della zonulina da parte della gliadina, che a sua volta porta all'ingresso di sempre maggiori quantità di glutine.

Nello studio DAISY era stato osservato che l'introduzione di glutine dopo 7 mesi di vita portava ad un lieve incremento del rischio di malattia, probabilmente dovuto ad una maggiore quantità di glutine introdotta nei bambini più grandi.³¹ Infatti, Iavarson et al. avevano osservato che i bambini affetti da malattia celiaca erano stati esposti all'epoca di introduzione del glutine a più alte dosi di glutine rispetto ai non affetti e che questa quantità aumentava tanto più tardiva era l'introduzione del glutine.⁴³ I nostri risultati suggeriscono che posticipando dopo i 12 mesi l'introduzione del glutine, ma mantenendo le stesse quantità che vengono normalmente introdotte a 4-6 mesi di vita, è possibile ridurre il rischio di malattia, garantendo un maggiore maturità dell'epitelio intestinale.

Il presente studio inoltre dimostra che la positività degli anticorpi AGA, EMA e tTG è evidente già all'età di 15 mesi, con una maggiore percentuale nei pazienti che

introducono glutine precocemente. Questo dato non conferma precedenti risultati che mostravano una positivizzazione sierologica tardiva nei bambini ad alto rischio di malattia,³¹ e che pertanto il primo screening all'età di 15 mesi può essere appropriato.

I nostri risultati non mostrano la presenza di un ruolo delle diverse molecole di HLA o del tipo di parentela sullo sviluppo della malattia celiaca.

Un dato importante emerso dal presente trial è, invece, il ruolo protettivo dell'allattamento materno. Risultati contrastanti derivanti da studi retrospettivi e prospettici erano presenti in letteratura al riguardo.³³ Una recente meta-analisi dei dati mostrava che i bambini allattati al seno al momento dell'introduzione del glutine nello svezzamento avevano un rischio di sviluppare la malattia celiaca ridotto del 52% rispetto ai bambini non allattati all'epoca dell'introduzione del glutine (OR 0.48; 95% CI: 0.40-0.59).²⁷ I nostri risultati confermano questo dato e sottolineano l'importanza dell'allattamento materno. Esistono diverse ipotesi relative al meccanismo con cui il latte materno può proteggere dal rischio di malattia celiaca: a) il latte materno contiene sostanze con attività immunomodulatoria sulla mucosa intestinale; b) i bambini allattati al seno durante l'introduzione del glutine ricevono meno quantità di glutine; c) il latte materno previene le infezioni intestinali, noto fattore di rischio nell'eziopatogenesi della malattia.³³

In conclusione, l'epoca tardiva di introduzione del glutine nella dieta è associata ad un rischio ridotto di malattia celiaca. Al momento non si può escludere la possibilità

che la precoce introduzione del glutine semplicemente porti ad una più precoce comparsa della malattia. Il follow-up a lungo termine di questa coorte di bambini ad alto rischio di malattia ci darà una risposta definitiva a questa domanda.

Sulla base dei risultati sopra riportati potrebbe essere indicato modificare le attuali raccomandazioni della Società Europea di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica (ESPGHAN)⁴⁴ che consigliano l'introduzione del glutine tra 4 e 7 mesi di vita. Se i nostri dati saranno confermati dai risultati successivi di un più lungo follow-up, potrebbe essere preferibile raccomandare l'introduzione di piccole quantità di glutine dopo i 12 mesi di vita, preferibilmente durante l'allattamento materno. Questo intervento dietetico potrebbe rappresentare la prima modalità di prevenzione primaria della malattia celiaca.

8. TABELLE

Tabella 1: Possibili manifestazioni cliniche della malattia celiaca.

Malattia celiaca maggiore	Malattia celiaca minore	Malattie autoimmuni associate	Malattie genetiche associate
Diarrea cronica	Anemia sideropenica	Diabete mellito tipo I	Sindrome di Down
Calo ponderale o arresto di crescita	Bassa statura	Tiroidine autoimmune	Sindrome di Turner
Distensione addominale	Osteoporosi	Epatite autoimmune	Sindrome di Williams
Ipotrofia muscolare	Artralgie	Sindrome di Sjogren	Difetti cardiaci congeniti
Inappetenza	Dermatite erpetiforme	Morbo di Addison	Deficit di IgA
Irritabilità	Ipoplasia dello smalto dentale	Gastrite atrofica autoimmune	
	Stomatite aftosa ricorrente	Malattie emocitopeniche autoimmuni	
	Dolori addominali ricorrenti	Psoriasi	
	Vomito	Alopecia areata	
	Ipertransaminasemia	Colangite sclerosante	
	Iperamilasemia	Miocardite autoimmune	
	Cefalea		
	Atassia		
	Epilessia		
	Polineuropatie		
	Lesioni della sostanza bianca		
	Cirrosi biliare primaria		
	Miastenia gravis		
	Pericardite ricorrente		
	Cardiomiopatia dilatativa		
	Infertilità		
	Aborti ricorrenti		
	Pubertà ritardata		

Tabella 2: Caratteristiche demografiche e cliniche dei due gruppi di studio.

	Gruppo A	Gruppo B	<i>p</i>
	(<i>n</i> : 384)	(<i>n</i> : 320)	
Sesso (M/F)	188/196	153/167	NS
HLA predisponente (n)	357 (93%)	296 (92%)	NS
Allattamento materno alla nascita (n)	326 (85%)	265 (83%)	NS
Durata allattamento materno (mesi)	8.3 (8.8)	6.7 (6.8)	NS

Tabella 3: Percentuale di bambini positivi agli anticorpi anti-gliadina (AGA) IgA e IgG e anticorpi anti-transglutaminasi (tTG) a 15, 24, 36 mesi e 5 anni nei due gruppi di studio.

	Gruppo A	Gruppo B	<i>p</i>
AGA IgA			
15 mesi	29 (9.5%)	13 (5.5%)	<0.05
24 mesi	21 (9.5%)	19 (10.5%)	NS
36 mesi	4 (2.8%)	11 (8.3%)	NS
5 anni	0	0	NS
AGA IgG			
15 mesi	67 (25.9%)	41 (20.2%)	NS
24 mesi	52 (27.5%)	31 (20.4%)	NS
36 mesi	24 (20%)	18 (15.9%)	NS
5 anni	6 (20%)	4 (26.7%)	NS
tTG			
15 mesi	15 (4.7%)	1 (0.4%)	<0.02
24 mesi	25 (10.6%)	15 (7.7%)	NS
36 mesi	8 (5.2%)	13 (9.1%)	NS
5 anni	0	0	NS

Tabella 4: Analisi multivariata delle variabili cliniche in relazione allo sviluppo di malattia celiaca.

	Malattia celiaca positiva (n=57)	Malattia celiaca negativa (n=647)	Hazard Ratio
Sesso			
Maschi	25 (44%)	342 (53%)	0.85
Femmine	32 (56%)	304 (47%)	1.0
Genotipo HLA			
positivo	57 (100%)	596 (92%)	5.9
negativo	0	51 (8%)	1.0
Durata allattamento materno	8.3	6.7	1.0
Allattamento materno durante introduzione del glutine			
Si	3 (5%)	362 (56%)	3.0
No	54 (95%)	284 (44%)	1.48

9. ICONOGRAFIA

Figura 1: Meccanismo del danno mucosale nella malattia celiaca.

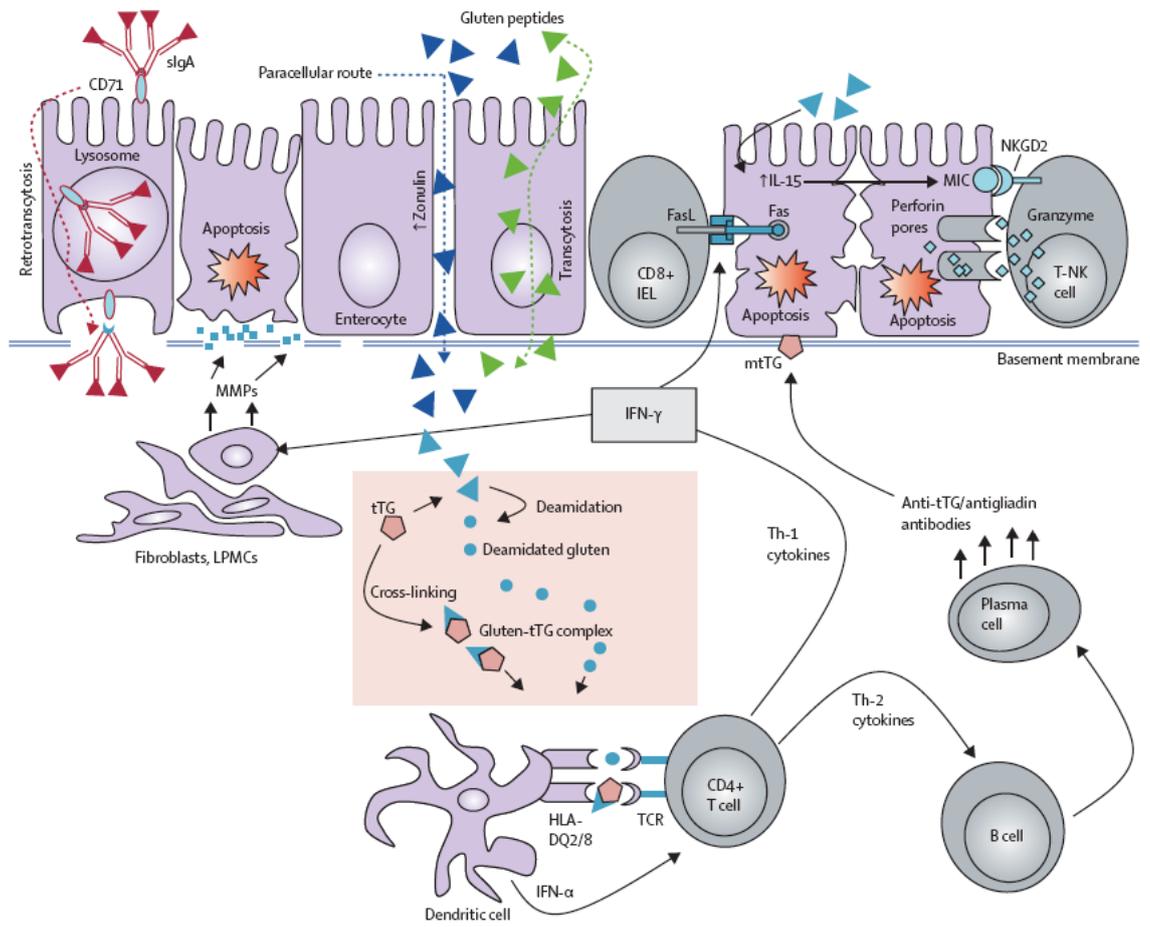


Figura 2: Quadri caratteristici di malattia celiaca maggiore con ipotrofia della radice degli arti (a) ed addome globoso (b).

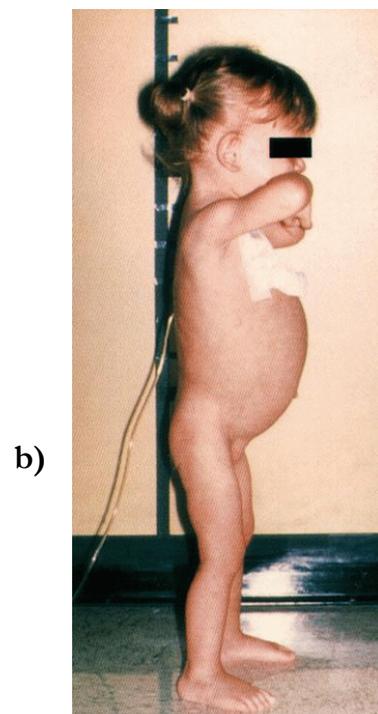
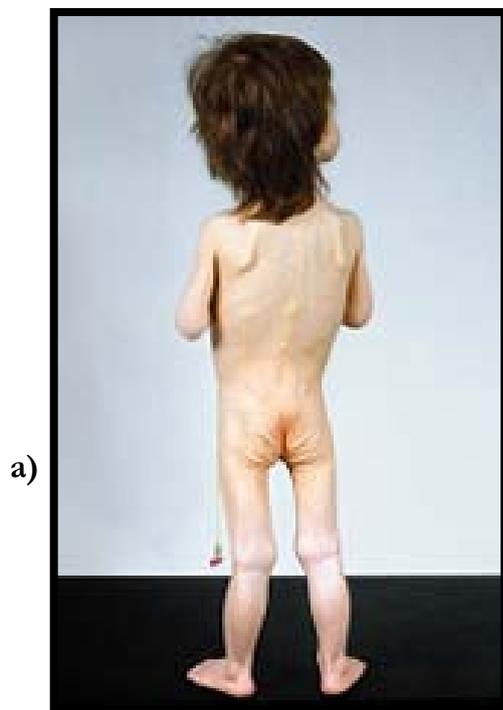


Figura 3: Tipico aspetto delle lesioni cutanee della celiachia (dermatite di Dhuring).



Figura 4: Diagramma dello studio.

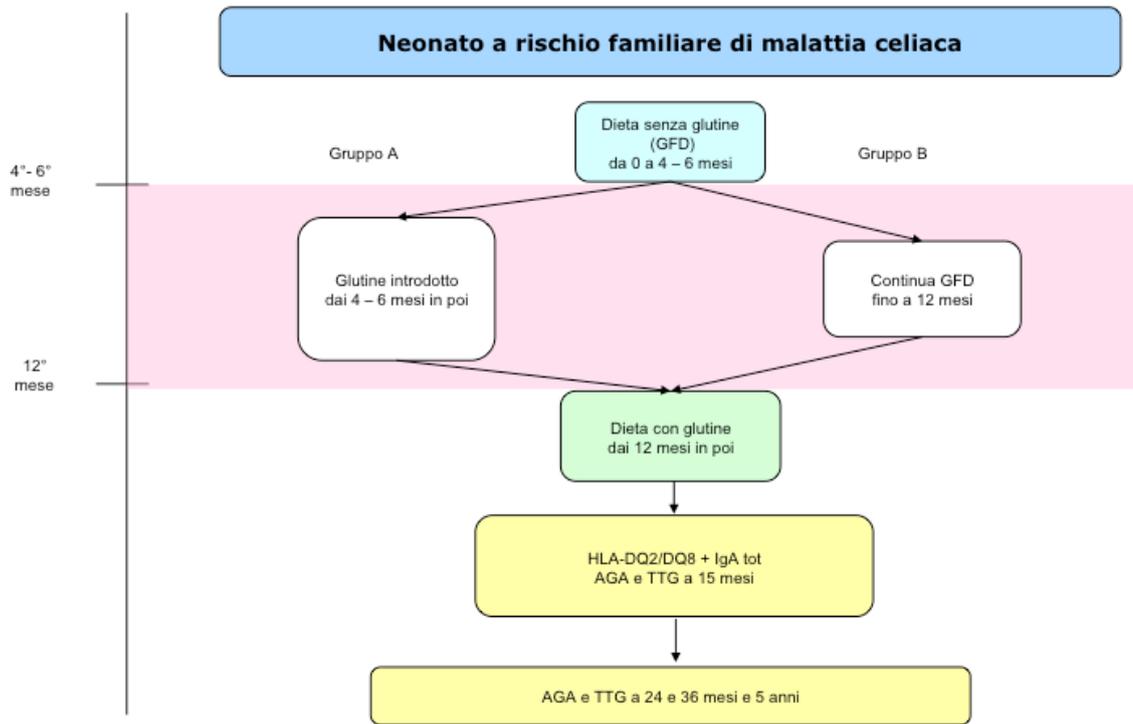


Figura 5: Numero di bambini arruolati in tutto il territorio nazionale.

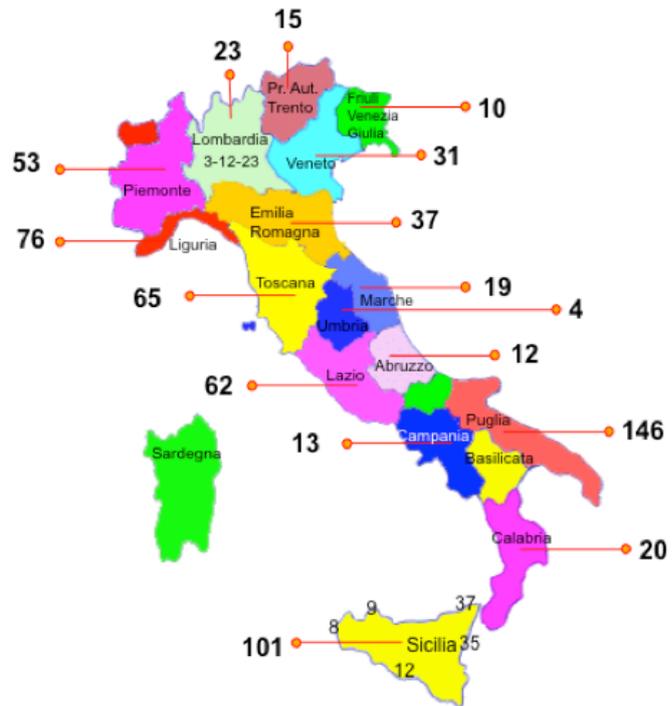


Figura 6: Percentuale di bambini allattati al seno nelle diverse epoche di controllo.

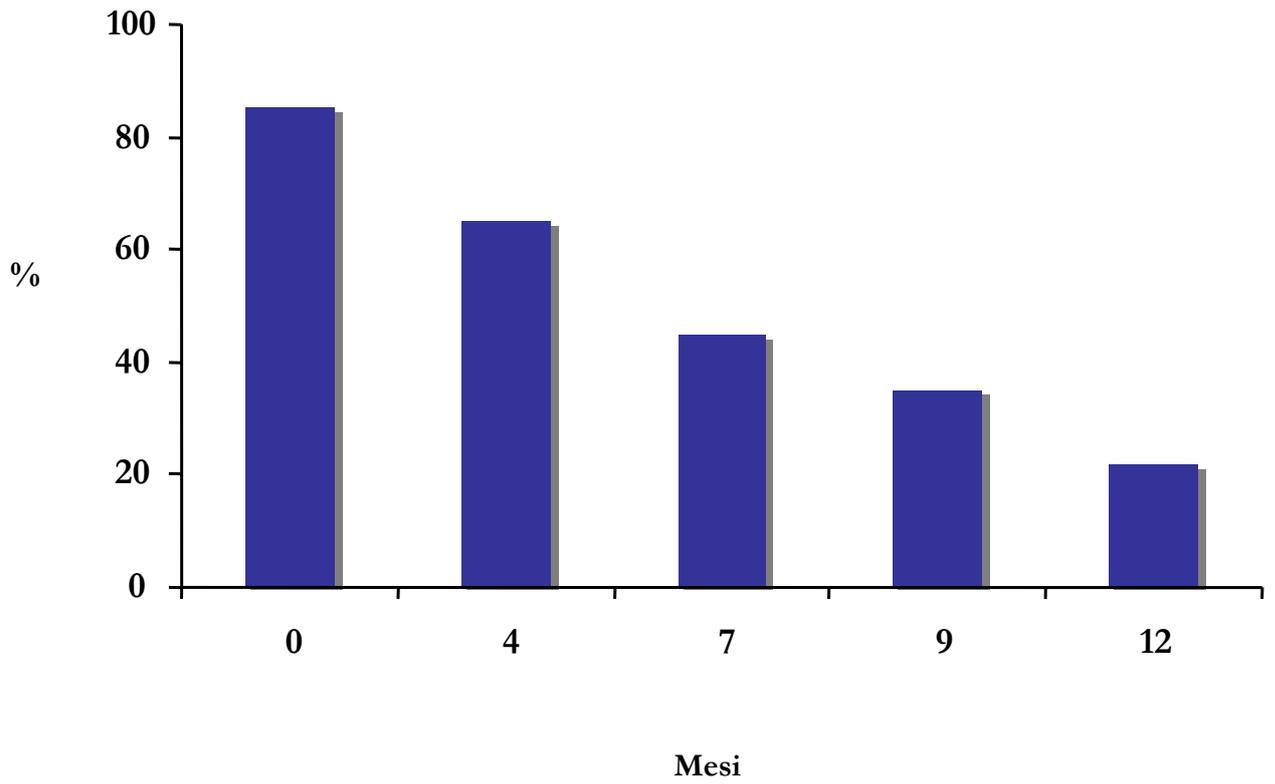


Figura 7: Distribuzione degli alleli HLA.

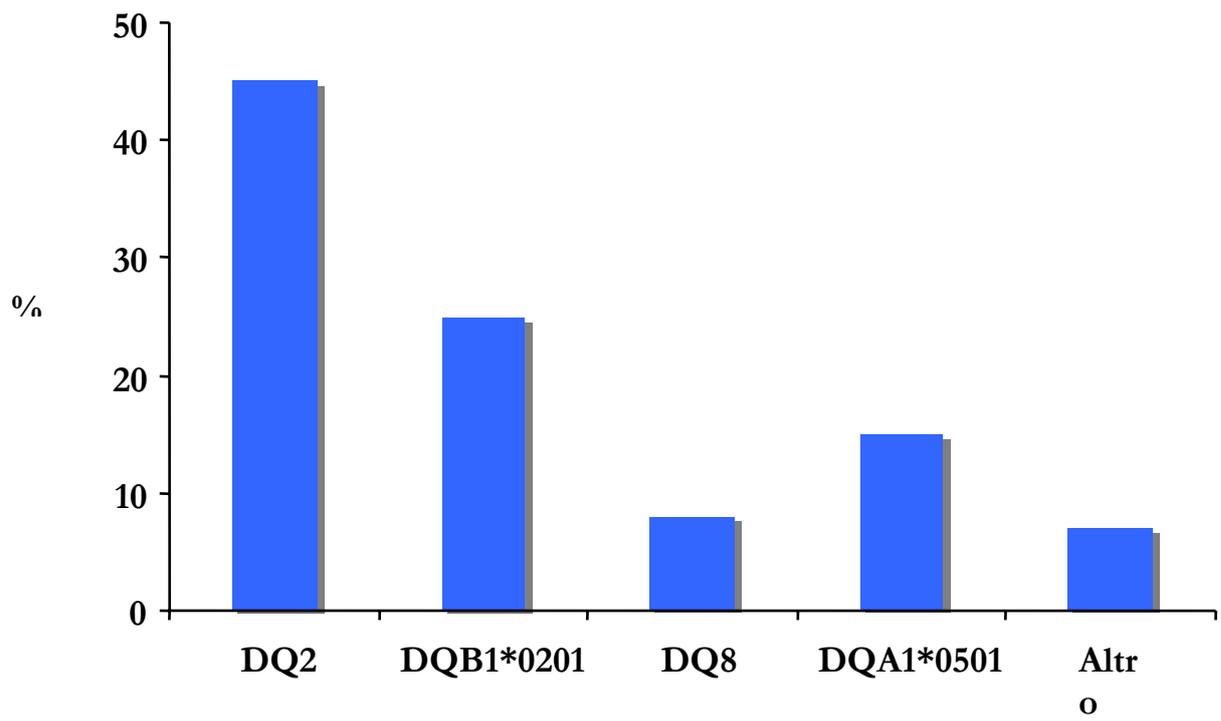


Figura 8: Incidenza di malattia celiaca nei due gruppi di studio 15, 24, 36 mesi e 5 anni.

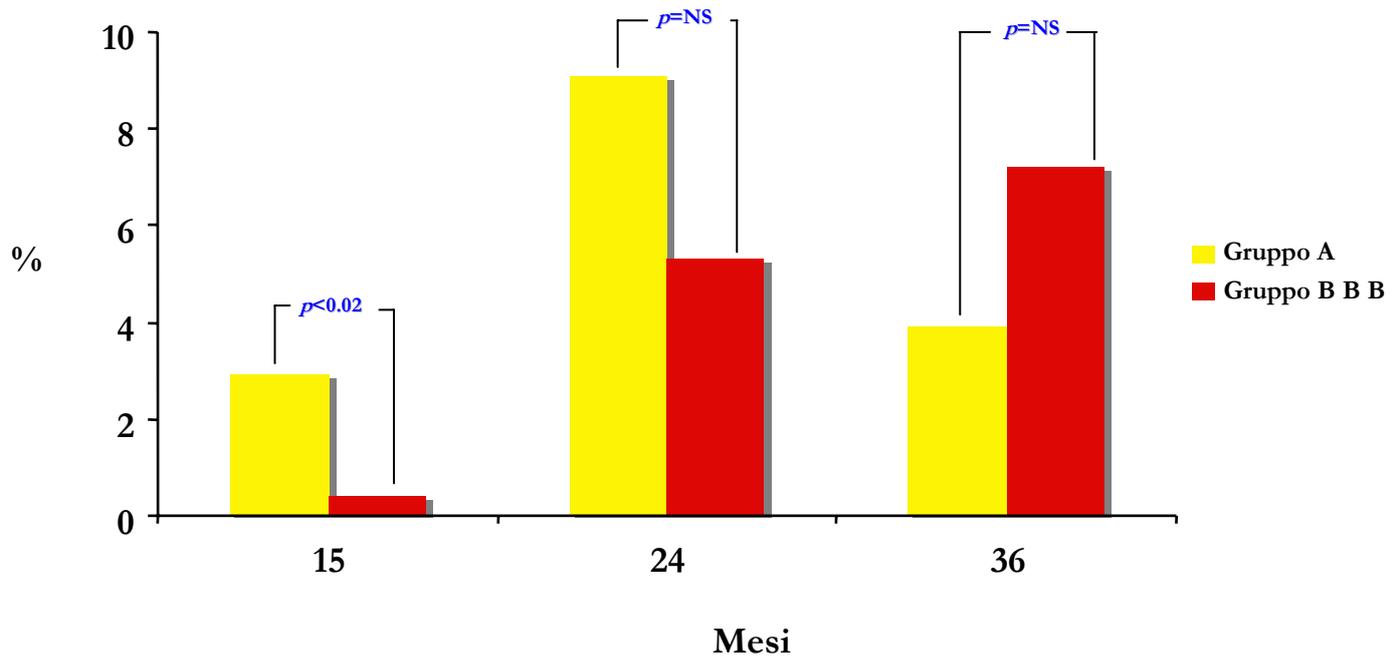
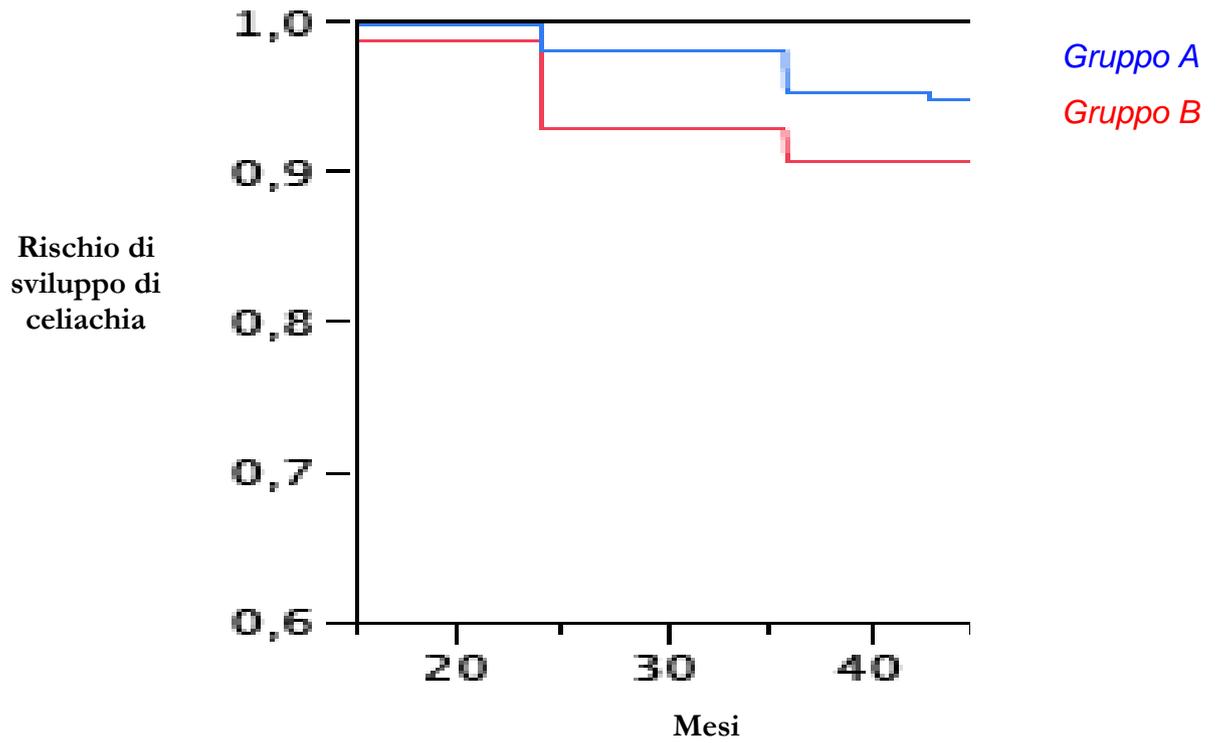


Figura 9: Analisi del rischio di sviluppare la malattia celiaca in base all'epoca di introduzione del glutine nello svezzamento (curva di Kaplan-Mayer).



10. BIBLIOGRAFIA

- 1) Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120: 636-51.
- 2) Catassi C. The world map of celiac disease. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2005; 35: 37-55.
- 3) Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 843-51.
- 4) Farrell RJ, Kelly CP. Celiac sprue. *N Engl J Med* 2002;346:180-8.
- 5) Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 41-9.
- 6) Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2(9):416-2
- 7) Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*. 2003;52:218-23.
- 8) Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet*. 2009;373:1480-93.
- 9) Fasano A. Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology* 2005;128(4 Suppl 1):S68-73.
- 10) Fasano A, Catassi C. Coeliac disease in children. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19(3):467-78.

- 11) Carroccio A, Iannitto E, Cavataio F, Montalto G, Tumminello M, Campagna P, Lipari MG, Notarbartolo A, Iacono G. Sideropenic anemia and celiac disease: one study, two points of view. *Dig Dis Sci* 1998;43(3):673-8.
- 12) Dewar DH, Ciclitira PJ. Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005;128(4 Suppl 1):S19-24.
- 13) Lionetti E, Francavilla R, Pavone P, Pavone L, Francavilla T, Pulvirenti A, Giugno R, Ruggieri M. The neurology of coeliac disease in childhood: what is the evidence? A systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 2010;52(8):700-7.
- 14) Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;65:909–11.
- 15) Marsh MN. Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut* 1990;31:111-4.
- 16) Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1185-94.
- 17) Hill ID. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterology* 2005; 128 (suppl): 25–32.

- 18) Volta U, Granito A, Fiorini E, Parisi C, Piscaglia M, Pappas G, et al. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci* 2008;53:1582-8.
- 19) See J, Murray JA. Gluten-free diet: the medical and nutrition management of celiac disease. *Nutr Clin Pract* 2006;21:1-15.
- 20) Fasano A. Surprises from celiac disease. *Sci Am* 2009;301:54-61.
- 21) Future therapeutic options for celiac disease. Sollid LM, Khosla C. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2(3):140-7.
- 22) Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:757-66.
- 23) Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, et al. A prospective, doubleblind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:160-6.
- 24) Auricchio S, Follo D, de Ritis G, Giunta A, Marzorati D, Prampolini L, Ansaldi N, Levi P, Dall'Olio D, Bossi A. Does breast feeding protect against the development of clinical symptoms of celiac disease in children? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983; 2: 428-433.

- 25) Greco L, Auricchio S, Mayer M, Grimaldi M. Case control study on nutritional risk factors in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7: 395-9.
- 26) Peters U, Schneeweiss S, Trautwein EA, Erbersdobler HF. A case-control study of the effect of infant feeding on celiac disease. *Ann Nutr Metab* 2001; 45: 135-42.
- 27) Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child* 2006;91:39-43.
- 28) Akobeng AK, Heller RF. Assessing the population impact of low rates of breast feeding on asthma, coeliac disease and obesity: the use of a new statistical method. *Arch Dis Child* 2007; 92: 483-5.
- 29) Persson LA, Ivarsson A, Hernell O. Breast-feeding protects against celiac disease in childhood--epidemiological evidence. *Adv Exp Med Biol* 2002; 503:115-23.
- 30) Agostoni C, Shamir R. Can a change in policy of complementary infant feeding reduce the risk for type 1 diabetes and celiac disease? *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;6:2-4.
- 31) Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, Taki I, Miao D, Haas JE, Emery LM, Sokol RJ, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Risk of celiac disease

- autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA* 2005; 293: 2343-51.
- 32) Strobel S. Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitisation. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 437-42.
- 33) Silano M, Agostoni C, Guandalini S. Effect of the timing of gluten introduction on the development of celiac disease. *World J Gastroenterol* 2010;16(16):1939-42.
- 34) Cummins AG, Thompson FM. Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut* 2002;51:748-54.
- 35) Guandalini S. The influence of gluten: weaning recommendations for healthy children and children at risk for celiac disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2007; 60:139-51.
- 36) Challacombe DN, Mecrow IK, Elliott K, Clarke FJ, Wheeler EE. Changing infant feeding practices and declining incidence of coeliac disease in West Somerset. *Arch Dis Child* 1997;77:206-9.
- 37) Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, Dannaeus A, Lindberg T, Lindquist B, Stenhammar L, Hernell O. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr* 2000; 89: 165-71.
- 38) Ivarsson A. The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach--some lessons to be learnt. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:425-40.

- 39) Myléus A, Ivarsson A, Webb C, Danielsson L, Hernell O, Högberg L, Karlsson E, Lagerqvist C, Norström F, Rosén A, Sandström O, Stenhammar L, Stenlund H, Wall S, Carlsson A. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:170-6.
- 40) Gupta R, Reddy DN, Makharia GK, Sood A, Ramakrishna BS, Yachha SK, Thapa BR, Banerjee R, Anuradha S, Dutta U, Puri AS, Jain AK, Mulder CJ, Kumar A, Boindala S. Indian task force for celiac disease: current status. *World J Gastroenterol* 2009;15:6028-33.
- 41) Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 2003;52:218-23.
- 42) Molberg O, McAdam SN, Korner R, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998;4:713-7.
- 43) Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 2002;75:914-21.
- 44) Agostoni C, Decsi T, Fewtrell M, Goulet O, Kolacek S, Koletzko B, Michaelsen KF, Moreno L, Puntis J, Rigo J, Shamir R, Szajewska H, Turck D, van Goudoever J. Complementary feeding: a commentary by the

ESPGHAN Committee on Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2008;46:
99-110.