

# UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIENCIAS DE  
LA SALUD



## TESIS DOCTORAL

### Enfermedad de Perthes y Trombofilia hereditaria

Realizada por: **María Dolores García Alfaro**

Dirigida por: **Dr Domingo González-Lamuño Leguina**

**Dra. María Ángeles Ballesteros Sanz**

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

**Santander 2021**



El Doctor **DOMINGO GONZÁLEZ-LAMUÑO LEGUINA**, Profesor Titular de Pediatría del departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad de Cantabria y la doctora **MARIA DE LOS ANGELES BALLESTEROS SANZ**, Doctora en Medicina por la Universidad de Cantabria.

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo de tesis doctoral que lleva por título: “ENFERMEDAD DE PERTHES Y TROMBOFILIA HEREDITARIA”, de la Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela, **Dña. MARIA DOLORES GARCÍA ALFARO** ha sido realizado bajo su dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos la presente en Santander

Prof. D.González-Lamuño

Dra. M.A.Ballestros Sanz



**Dña. MARÍA DOLORES GARCÍA ALFARO** CON D.N.I 32670380F, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela

**CERTIFICA:**

Ser la autora de la presente tesis titulada: “ENFERMEDAD DE PERTHES Y TROMBOFILIA HEREDITARIA”, dirigida por los doctores D. Domingo González-Lamuño Leguina y Dña. María de los Ángeles Ballesteros Sanz y presentada para optar al grado de doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Cantabria.

Y para que así conste, firmo la presente en Santander

Dña. M<sup>a</sup> Dolores García Alfaro

A mi familia y amigos.



# **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi gratitud a todas aquellas personas que, en mayor o menor medida, han contribuido a la realización de esta tesis. De manera especial:

- A mis padres y hermanos, que siempre están ahí.
- A Geles, su marido Manu y al pequeño Lucas por las tardes en su casa para que esta tesis viese la luz.
- A Domingo por la ayuda y recomendaciones que han hecho posible que realizase esta tesis.
- A Maribel, tanto en el plano personal como en el profesional.
- A María Teresa Amigo Lanza porque sin ayuda con el análisis de laboratorio esta tesis no hubiera sido posible.
- A Carmelo, mi compañero de Unidad, por darme todas las facilidades para poder terminar esta tesis y aguantarme en el día a día del trabajo.

**Listado de abreviaturas.**

**AP:** Anteroposterior.

**°C:** Grados Celsius.

**df:** Grados de libertad.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**dNTP:** Desoxirribonucleótidos trifosfato.

**DS:** Desviación estándar.

**EDTA:** Ácido etildiaminotetraacético.

**GP IIb/IIIa:** Glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.

**h:** Hora

**IC:** Intervalo de confianza.

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio.

**mg:** Miligramos.

**mi:** Minuto

**ml:** Mililitro.

**mM:** miliMolar.

**MTHFR:** Metilen tetrahidrofolato reductasa.

**OR:** Odds Ratio.

**p:** Nivel de significación estadística.

**PCA:** Proteína C activada.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**pb:** Par de bases nitrogenadas.

**RFLP:** Análisis de los Fragmentos de Restricción.

**sg:** Segundo.

**μl:** Microlitro.

**μM:** Micra.

**VS:** Versus.

**X<sup>2</sup>:** Chi cuadrado.

Índice

## ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Trombofilia hereditaria.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Mutación del factor V de coagulación. Factor V Leiden...</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2. Mutación génica G20210A del factor II (protrombina)....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3. Mutación C677T de la metilentetrahidrofolato</b> <b>reductasa (MTHFR).....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.4. Polimorfismo del gen de la glicoproteína plaquetaria</b> <b>IIb/IIIa.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Definición de la Enfermedad de Perthes.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Epidemiología de la Enfermedad de Perthes.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Etiopatogenia de la Enfermedad de Perthes.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1. Teoría vascular. Vascularización de la cabeza femoral</b> <b>en el niño.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2. Teoría inflamatoria.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.3. Alteraciones de la coagulación.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.4. Enfermedad multifactorial.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4.5. Hiperactividad o trastorno de déficit de atención.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.6. Hipótesis “unificadora”.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5. Alteraciones Anatómo-patológicas.....</b>	<b>23</b>

1.6. Clínica.....	26
1.7. Clasificación de la Enfermedad de Perthes.....	27
1.8. Historia natural y factores de riesgo de la Enfermedad de Perthes.....	36
1.9. Tratamiento.....	38
<b>2. Justificación y Objetivos.....</b>	<b>41</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>45</b>
3.1. Pacientes.....	46
3.2. Controles.....	47
3.3. Análisis genético.....	48
3.3.1. Extracción del DNA.....	48
3.3.2. Determinación del polimorfismo PIA <sup>2</sup> del gen de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.....	49
3.3.3. Determinación del polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa.....	51
3.3.4. Determinación del polimorfismo G1691A del gen del Factor V de Leiden.....	53
3.3.5. Determinación del polimorfismo G20210A del gen de la protrombina.....	55
3.4. Análisis estadístico.....	57

<b>4. Resultados.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. Análisis estadístico de la serie de niños con enfermedad de Perthes.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1.1. Evolución clínica. ....</b>	<b>65</b>
<b>4.1.1.1.Evolución clínica según la actitud adoptada .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1.1.2.Evolución clínica tras la actitud adoptada dependiendo de la edad de diagnóstico.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1.1.3.Evolución clínica tras la actitud adoptada dependiendo de la afectación bilateral.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1.1.4.Evolución clínica tras la actitud adoptada dependiendo del sexo de los pacientes.....</b>	<b>70</b>
<b>4.1.1.5.Evolución clínica tras la actitud adoptada dependiendo de la gravedad de la enfermedad de Perthes al diagnóstico.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2. Distribución de los genotipos y de las frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados del Factor V, protrombina, MTHFR y glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en los pacientes diagnosticados de enfermedad de Perthes.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2.1.Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo de la afectación unilateral o bilateral.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2.2.Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo del sexo de los pacientes. ....</b>	<b>74</b>

<b>4.2.3.</b> Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo de la edad de debut de la enfermedad de Perthes.....	74
<b>4.2.4.</b> Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo de la actitud terapéutica adoptada.....	78
<b>4.2.5.</b> Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo de la gravedad al diagnóstico de la enfermedad de Perthes, evaluada según la clasificación de Catterall.....	78
<b>4.3.</b> Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de los polimorfismos del Factor V, protrombina, MTHFR y glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en los pacientes con enfermedad de Perthes versus controles (adolescentes del proyecto AVENA de Santander).....	81
<b>4.3.1.</b> Mutación del Factor V ( Factor V de Leiden).....	81
<b>4.3.2.</b> Polimorfismo C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).....	82
<b>4.3.3.</b> Polimorfismo PIA <sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.....	82
<b>4.3.4.</b> Mutación G20210A de la protrombina.....	83
<b>4.4.</b> Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de los polimorfismo del Factor V, protrombina, MTHFR y glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en las caderas con enfermedad de Perthes versus controles.....	85
<b>4.4.1</b> Polimorfismo PI A <sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.	85

4.4.2 Mutación C677T de la metilentratetrahidrofolato reductasa (MTHFR).....	85
4.4.3 Mutación del Factor V (Factor V Leiden).....	86
4.4.4 Mutación G20210A de la protrombina.....	86
4.5. Distribución de los haplotipos de la mutación C677T de laMTHFR y del polimorfismo PIA2 de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en los pacientes diagnosticados de enfermedad de Perthes.....	88
<b>5. Discusión.....</b>	<b>93</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>111</b>
<b>7. Anexo I.....</b>	<b>115</b>
<b>8. Anexo II.....</b>	<b>116</b>
<b>9. Anexo III.....</b>	<b>117</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>131</b>
<b>11. Producción Científica.....</b>	<b>149</b>

# Introducción

## **1. Introducción**

La enfermedad de Legg-Calvé-Perthes, o enfermedad de Perthes, es una patología común de la cadera infantil que consiste en una necrosis avascular de la epífisis femoral proximal.

Fue descrita de forma simultánea e independiente por Legg (Legg AT, 1910; Legg AT, 2006), Calvé (Calvé J, 1910; Calvé J, 2006) y Perthes (Perthes G, 1910; Perthes G, 2012) en el año 1910. Se consideró durante algunos años un procesos infeccioso (una forma de tuberculosis ósea de cadera), pero fue finalmente Perthes quien describió las características histológicas de la enfermedad, pasándola a llamar “ostecondritis deformante juvenil” (Elly, 1919).

A pesar de que han transcurrido casi 100 años de investigación y de que se conoce la fisiopatología, las manifestaciones clínicas y la evolución natural de la enfermedad, todavía se ignora su etiología.

Las descripciones histopatológicas de Catterall y asociados (Catterall y cols., 1982), y de Ponseti y asociados (Ponseti y cols., 1983) indican dos posibles vías para la necrosis ósea: que el evento o los eventos vasculares son primarios; o que puede haber un trastorno primario del cartílago epifisario, que causa el colapso y la necrosis.

La causa de la pérdida de vascularización permanece desconocida. Se han propuesto varias etiologías, pero ninguna ha demostrado la causa de la enfermedad. Las teorías más ampliamente aceptadas tienen que ver con la interrupción vascular repetida del aporte sanguíneo a la cabeza femoral, dando lugar a una oclusión venosa con la secundaria hipertensión venosa y muerte ósea.

La enfermedad de Perthes se ha relacionado con hipofibrinólisis y trombofilia (Kealey W y cols., 2000). Por otra parte informes recientes han sugerido que trastornos trombofílicos hereditarios pueden ser una de las causas patogénicas de la enfermedad. No obstante, la causa permanece sin esclarecer.

### **1.1. Trombofilia hereditaria**

En 1995, la Organización Mundial de la Salud y la *International Society of Thrombosis and Hemostasis* definieron la trombofilia como una tendencia anormal a la trombosis, que se caracteriza por manifestaciones como la edad de inicio temprana, episodios recurrentes, antecedentes familiares notables, localizaciones poco habituales, migratorias o generalizadas y una gravedad desproporcionada respecto al estímulo identificado (Xu W y cols., 2011). También hace referencia a los estados de hipercoagulabilidad que son el resultado final de enfermedades, trastornos o alteraciones que

potencian la propensión del individuo a que se formen coágulos de sangre en el sistema venoso, arterial o microcirculatorio (De Stefano V y cols.,2002).

Los estados de hipercoagulabilidad primarios se deben a una alteración cuantitativa o cualitativa de proteínas de la coagulación específicas, que inducen un estado protrombótico. La mayoría de estos trastornos se deben a mutaciones hereditarias y polimorfismos que condicionan: 1) la deficiencia de un factor antitrombótico fisiológico o 2) el aumento de un factor protrombótico (Schafer, 2013).

En especial, cuando se combinan con otras mutaciones protrombóticas hereditarias (interacciones multigénicas), estos cuadros de hipercoagulabilidad primarios se asocian a una predisposición a la trombosis durante toda la vida (Soria JM, 2009)

En los últimos años se ha reconocido la importancia del componente genético en la patogénesis de los eventos tromboticos venosos y arteriales (Seligsohn U, 2001). Uno de cada 5 pacientes afectados por trombosis venosa tiene algún defecto genético específico de sus vías de coagulación. En la mayoría de pacientes con trombofilia hereditaria el primer evento trombotico ocurre antes de los 45 años.

En estos casos de trombofilia hereditaria, la trombosis se produce por un fracaso en el control de la generación o de la neutralización de la trombina. La combinación de distintas alteraciones genéticas aumenta

significativamente el riesgo y la precocidad de trombosis venosa (De Stefano V y cols., 1996).

Las anomalías genéticas asociadas a trombofilia y que pueden ser estudiadas en la actualidad incluyen la mutación del factor V de la coagulación (Factor V Leiden), la mutación G20210A de la protrombina y la mutación C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa.

### **1.1.1. Mutación del factor V de la coagulación (Factor V Leiden).**

El Factor V es una glicoproteína de 300 Kd, codificada por el gene F5 que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (locus 1q23) y está compuesto por 25 exones. La mutación conocida como Leiden se produce por sustitución de G por A en el nucleótido 1691 (G1691A), en el exón 10, lo que genera un reemplazo en el aminoácido 506 de la proteína de una Arginina (R) por una Glutamina (Q) (R506Q o alelo Q506). Esta posición es uno de los sitios de clivado por PCA (proteína C activada) en el factor V normal. El cambio aminoacídico destruye el sitio natural de clivado y limita la degradación del Factor V. Funcionalmente resulta en una resistencia a la PCA, por lo que se pierde el efecto anticoagulante del FV activado (Bertina y cols., 1994).

El riesgo de tromboembolismo venoso es 2-7 veces mayor entre los heterocigotos y 40 a 80 veces más alto entre los homocigotos (Martinelli I y cols., 2000; Simioni P y cols., 2002).

Tiene una incidencia de 3% a 5% en la población general, elevando el riesgo de trombosis en pacientes afectados durante el transcurso de sus vidas.

La prevalencia de factor V Leiden en la población española oscila entre 1,2% a 3,9%, pero en el grupo de pacientes con una historia de enfermedad tromboembólica oscila desde 8% a 14,1% (Álvarez A y cols., 1999; Llamas Sillero P y cols., 2001).

### **1.1.2. Mutación génica G20210A del factor II (protrombina).**

La mutación puntual G20210A del gen de la protrombina, que se localiza en el locus 11p-q12 del gen F2, ocasiona hipercoagulabilidad, aumentando la generación de trombina (Poort y cols., 1996).

Esta mutación tiene una incidencia del 2% en la población general y se ha demostrado que se encuentra en el 4% al 8% de los pacientes con un primer evento trombótico. Esta condición eleva dos a tres veces el riesgo de trombosis en pacientes afectados en comparación con la población general.

En la población española la prevalencia de la mutación en pacientes con enfermedad tromboembólica oscila de 9,1% a 12%, pero la prevalencia en sujetos sanos es de aproximadamente 3,5% (Llamas Sillero P y cols., 2001).

### **1.1.3. Mutación C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).**

La mutación o polimorfismo C677T del gen para el enzima MTHFR es un hallazgo frecuente en la población caucasiana, encontrándose hasta en el 38% de los sujetos no seleccionados, siendo poco frecuente en raza negra, nativos de América del Sur y aborígenes de Oceanía (Franco RF y cols., 1998). La condición de homocigosidad para esta mutación es sorprendentemente común, con alrededor del 10% de la población afecta (Wald DS y cols.2002).

El gen de la MTHFR se localiza en el cromosoma 1p36.2 y la mutación C677T descrita por Frosst (Frosst y cols., 1995) consiste en la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677. Tal mutación origina la sustitución de una alanina por una valina en la posición 223 de la proteína. Este cambio de aminoácido genera una variante de MTHFR termolábil, caracterizada por una reducción del 50% de su actividad a 37°C, en comparación con la variante normal. En consecuencia, se reduce la capacidad del metabolismo de la homocisteína y puede aparecer una hiperhomocisteinemia leve-moderada, sobre todo cuando la mutación se encuentra en homocigosis, y especialmente si se asocian bajas concentraciones séricas de folatos.

La hiperhomocistinemia se ha asociado a un riesgo elevado de eventos trombóticos (podría alterar los mecanismos de coagulación y la resistencia del endotelio a la trombosis). Es controvertido el papel de este pequeño aumento en la trombosis venosa (González Porrás, 2010).

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo de arteriosclerosis coronaria, cerebral, periférica y aórtica. Este riesgo es independiente de otros factores de riesgo cardiovascular, y es mayor cuanto mayor sea la concentración de homocisteína. Sin embargo, los estudios prospectivos muestran resultados aún contradictorios. La hiperhomocisteinemia se asocia también a un mayor riesgo de enfermedad tromboembólica que podría estar modulado por otras alteraciones de la coagulación como el factor V Leiden.

La hiperhomocisteinemia es un aumento de las concentraciones sanguíneas de la homocisteína, que es un aminoácido sulfhídrico derivado de la metionina por una vía de transmetilación. La homocisteína se remetiliza a metionina o se cataboliza a cistationina. La principal vía de remetilación necesita de folato y cobalamina (vitamina B12) e implica la acción de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). La concentración sérica elevada de la homocisteína es un factor importante de riesgo de enfermedad arterial oclusiva y tromboembolismo venoso (Falcon CR y cols., 1994; De Stefano V y cols., 2000).

Los mecanismos por los que la hiperhomocisteinemia se convierte en un factor de riesgo cardiovascular y contribuye al proceso de la arteriosclerosis no están del todo claros. Estudios en modelos animales han demostrado que el aumento de las concentraciones plasmáticas de Hcy ocasiona un incremento del estrés oxidativo, produce daño en la función endotelial e incrementa la trombogenicidad, todo lo cual favorece la aterosclerosis (Wierzbicki, 2007).

### **1.1.4. Polimorfismo del gen de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.**

El complejo glicoproteico  $\alpha$ IIb/ $\beta$ IIIa o glicoproteína GPIIb/IIIa es un heterodímero que aparece en la membrana de las plaquetas, megacariocitos, osteoclastos y células endoteliales. En una plaqueta normal, existen alrededor de 80.000 copias de este complejo glicoproteico. En las plaquetas en reposo actúa como receptor con muy baja afinidad de adhesión para las superficies cubiertas de fibrinógeno, pero con la activación plaquetaria se produce un cambio conformacional de los dominios exoplásmicos del complejo que lo hace competente para la adhesión al fibrinógeno soluble y a otras proteínas plasmáticas de adhesión con secuencias específicas, entre las que se encuentra el factor de Von Willebrand, la vitronectina, la fibronectina y la trombospondina. La unión simultánea de las moléculas de fibrinógeno a los receptores de plaquetas adyacentes, conlleva una agregación de las mismas, lo cual promueve la

fijación de los complejos fibrinógeno-GPIIb/IIIa al citoesqueleto plaquetario. De este modo, se crea la unión física necesaria para que pueda producirse la retracción del coágulo (Lefkovits y cols., 1995).

Como en muchas glicoproteínas plaquetarias, el gen para el receptor plaquetario GPIIb/IIIa tiene un elevado carácter polimórfico. En este sentido, ha sido descrito un polimorfismo específico en el exón 2 del gen que condiciona un cambio de prolina por leucina en el codón 33 de la molécula del receptor. A este polimorfismo se le conoce como PIA2 (resultado de la mutación T1565C). Se postula que conlleva un aumento de la unión del fibrinógeno al receptor GPIIb/IIIa, con el consiguiente aumento de la agregación plaquetaria y formación de trombos (Weiss y cols., 1996). Por otro lado, tratándose de una integrina o molécula que condiciona una interacción entre la plaqueta activa y la matriz extracelular, se atribuyen diferentes tipos de respuesta de reparación endotelial y vascular a las diferentes variantes polimórficas de esta glicoproteína.

Este alelo es observado en el 15% de la población caucásica con una distribución de genotipos: 71% A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub>, 27% A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> y 1-2% A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>. Se asocia con la enfermedad coronaria arterial (Hessner y cols, 2001).

## **1.2. Definición de la Enfermedad de Perthes.**

La enfermedad de Legg-Calvé-Perthes es una necrosis avascular idiopática que acontece en la cabeza femoral del paciente esqueléticamente inmaduro en la época de máxima capacidad osteogénica.

El proceso de necrosis se sigue de un proceso de revascularización y reparación con reabsorción y aposición de hueso que es biológica y mecánicamente menos resistente a las fuerzas deformantes que se ejercen sobre la cadera del niño seguido de un proceso de remodelación y curación de la cabeza femoral con o sin secuelas (Kim H, 2014).

## **1.3. Epidemiología de la Enfermedad de Perthes.**

La enfermedad de Perthes afecta por lo general a niños con edades comprendidas entre los 4 y los 8 años, pero se puede presentar desde los 18 meses hasta la madurez esquelética (WiigO y cols., 2001; Joseph B y cols., 2001).

Su incidencia anual varía según la región geográfica (Molloy MK y cols., 1966) entre el 0,2 y el 29,4 por 100.000 habitantes, se ha observado una mayor incidencia en la raza caucásica siendo menos frecuente en asiáticos (Rowe SM y cols., 2005) y excepcional en individuos de raza negra (Purry NA, 1982; Perry y Hall, 2011). Además, la incidencia se asocia con factores

demográficos, como la densidad de población y status socioeconómico (Kealey WD y cols., 2000; Margretts BM y cols., 2001; Pillai A y cols., 2005), predomina en comunidades urbanas y en grupos socioeconómicos bajos.

Es más común en niños que en niñas, con una relación de 4-5:1 y aunque en el 8-12% de los casos existe una historia familiar, actualmente no hay evidencias de un patrón hereditario (Harper PS y cols., 1976; Tachdjian's, 2014).

La afectación puede ser bilateral en el 10-15 % de los pacientes (Wiig O y cols., 2006; Kenet G y cols., 2008).

### **1.4. Etiopatogenia de la Enfermedad de Perthes.**

El origen de la enfermedad de Perthes es probablemente multifactorial y su causa exacta es desconocida. Existen diversas teorías basadas en la asociación del trastorno con determinados factores.

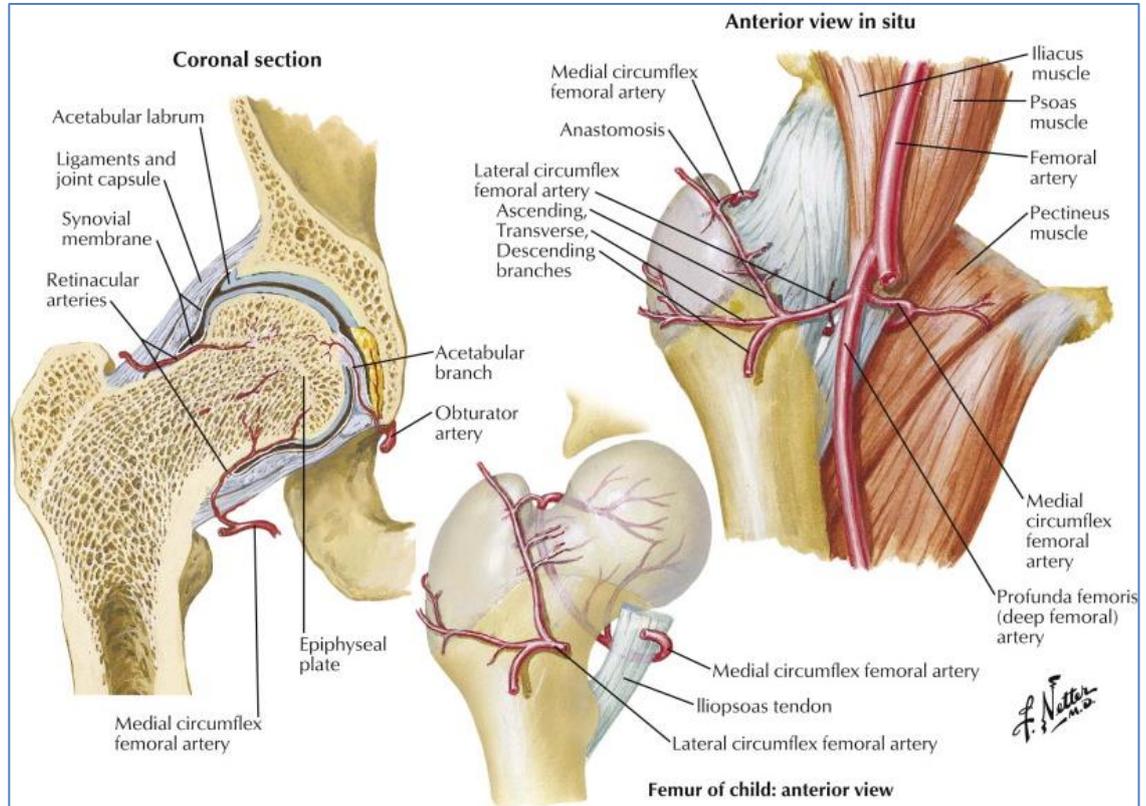
#### **1.4.1 Teoría vascular. Vascularización de la cabeza femoral en el niño.**

El hecho de que el fenómeno fisiopatológico que se produce es una necrosis isquémica ha llevado a algunos investigadores a buscar una teoría vascular (Atsumi y cols., 2000).

El aporte sanguíneo arterial de la cabeza femoral pediátrica (figura.1.1) se realiza a través de una pequeña contribución de la arteria del ligamento redondo que es rama de la arteria obturatriz y fundamentalmente a través del anillo vascular cervical extracapsular.

Este anillo está formado por la anastomosis de la arteria circunfleja femoral medial que rodea el cuello femoral posteriormente y de la arteria circunfleja femoral lateral que lo hace anteriormente. Ambas arterias son ramas de la arteria femoral profunda. El anillo cervical recibe también contribuciones menores de las arterias glúteas superior e inferior.

Del anillo vascular cervical extracapsular nacen las ramas cervicales ascendentes que a su vez dan lugar a los vasos retinaculares. Estos vasos atraviesan la cápsula articular y la sinovial y se convierten en vasos intraóseos y originan el anillo vascular subsinovial del que parten arteriolas que atraviesan el cartílago hialino que rodea al núcleo epifisario y forman arcadas que irrigan la totalidad de la cabeza femoral. Ramas terminales muy importantes en la irrigación de la epífisis en el paciente esqueléticamente inmaduro son la arteria epifisaria lateral y una rama terminal de esta, la arteria central de la epífisis.



*Figura. 1.1. Vascularización de la cabeza femoral en el niño. Fuente: Netter FH. Arteries of femoral head and neck. En: Atlas of Human Anatomy.6<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Elsevier.2014.507-576.*

Estudios angiográficos han demostrado la obstrucción de las arterias capsulares superiores de la cabeza femoral en pacientes afectados de enfermedad de Perthes , así como una reducción general del flujo sanguíneo con un descenso significativo del flujo de la arteria circunfleja medial. (Theron, 1980; de Camargo y cols, 1984; Atsumi y cols., 2000;). También la gammagrafía con tecnecio ha demostrado una reducción en el flujo

sanguíneo en la arteria femoral en el lado afectado en los estadios iniciales de la enfermedad (Wingstrand y cols., 1985).

Distintos estudios experimentales (Sanchís y cols., 1973) han encontrado que un único episodio de infarto de la cabeza femoral no reproduce los cambios anatómicos vistos en la enfermedad de Perthes, y que son necesarios varios infartos para producir el cuadro patológico característico de la enfermedad (Inoue y cols., 1976).

Por otro lado, se ha detectado un drenaje venoso anormal de cabeza y cuello femoral en pacientes con enfermedad de Perthes (Green y Griffin, 1982). Este drenaje normalmente fluye a través de la vena circunfleja medial, pero en pacientes con Perthes existe una presión venosa aumentada en el cuello femoral y una congestión venosa metafisaria, y el drenaje venoso se produce más distalmente a través de venas diafisarias. Aunque estas anomalías en el drenaje venoso son un hallazgo consistente en la enfermedad de Perthes, todavía no está claro si son la causa del trastorno o el resultado de algún otro factor (Liu y Ho, 1991).

### **1.4.2 Teoría inflamatoria.**

La sinovitis transitoria de cadera se ha considerado durante algunos años un posible factor causal, debido al daño producido en los vasos epifisarios por el aumento de presión intraarticular. Sin embargo esta teoría no se ha

confirmado y actualmente se considera que lo que sucede es una irritación sinovial secundaria a la necrosis de la epífisis (Landin y cols., 1987).

### **1.4.3 Alteraciones de la coagulación.**

Los trabajos de Glueck y Eldridge (Glueck y cols., 1994; Glueck y cols., 1996; Eldridge y cols., 2001) han relacionado la enfermedad de Perthes con deficiencias en las proteínas C y S y la presencia de hipofibrinólisis. La resistencia a la proteína C activada parece jugar un papel importante en la patogénesis de este trastorno. Se postuló que la trombofilia podía causar una trombosis venosa en la cabeza del fémur, con hipertensión venosa y la muerte hipóxica del hueso causando la enfermedad de Perthes.

Otros autores han encontrado relación entre la enfermedad y la mutación del factor V de la coagulación (factor V Leiden) (Glueck y cols., 1997; Balasa y cols., 2004) y la mutación G20210A de la protrombina (Vosmaer y cols., 2010). Sin embargo en otros muchos estudios no se repiten estos resultados (Arruda y cols., 1999; Gallistl y cols., 1999; Thomas y cols., 1999; Hresko y cols., 2002; Sirvent y cols., 2000; Kenet y cols., 2008).

Para algunos autores no parece probable que esta sea la causa de la enfermedad por varias razones:

- es más frecuente en niños que en niñas (4-5:1). Las deficiencias que causan trombofilia hereditaria son autosómicas dominantes,

por lo que se esperaría el mismo número de niños que de niñas (De Stefano V y cols., 1996).

- la trombofilia hereditaria se asocia con mayor tendencia a tromboembolismo venoso, especialmente si se asocia a factores de riesgo circunstancial (cirugía, inmovilización). Tras la cirugía de cadera en la enfermedad de Perthes no se encuentra esta mayor frecuencia de sucesos tromboembólicos (De Stefano V y cols., 1994).

#### **1.4.4. Enfermedad multifactorial.**

Esta teoría defiende que la enfermedad de Perthes estaría causada por la confluencia de factores genéticos y ambientales.

Aunque la incidencia de historia familiar positiva en pacientes con enfermedad de Perthes oscila desde 1,6% hasta el 20%, actualmente no hay evidencias de que la enfermedad de Perthes sea una condición hereditaria. Factores como el bajo nivel socioeconómico, el ámbito rural, padres desempleados, familias numerosas, se han relacionado con la enfermedad de Perthes. Esto podría sugerir una influencia nutricional en la etiología de la enfermedad (Hall AJ y cols., 1989; Weinstein, 2006).

Hay estudios que relacionan la exposición pasiva a humo de tabaco (García Mata S y cols., 2000; Gordon JE y cols., 2004) así como el consumo de

tabaco materno durante el embarazo con la enfermedad de Perthes (Bahmanyar y cols. 2008).

#### **1.4.5. Hiperactividad o trastorno de déficit de atención.**

Algunos niños con enfermedad de Perthes tienden a ser extremadamente activos físicamente y algunos son patológicamente hiperactivos o sufren de trastorno de déficit de atención, si bien aún se debe esclarecer el papel de la hiperactividad en este trastorno (Loder y cols., 2003).

#### **1.4.6. Hipótesis “unificadora”.**

Propone que en un niño constitucionalmente predispuesto sobrevendría un traumatismo que daría lugar a una isquemia de los vasos nutricios intraóseos, siendo necesario que ocurran al menos dos episodios de interferencia o cese vascular para que se pongan en marcha los mecanismos patogénicos que conducen a los cambios anatomopatológicos característicos del Perthes (teoría del doble infarto) (Inoue y cols., 1976; Malagón, 1999).

#### **\* Factores constitucionales predisponentes.**

- Historia familiar: Se han descrito cambios similares a los que acontecen en la enfermedad de Perthes en familias japonesas portadoras de una mutación del gen COL2A1 que codifica la síntesis de colágeno tipo I (Tachdjian´s, 2014).

- Raza: La enfermedad es más frecuente en la raza caucásica, en japoneses y esquimales que en la raza negra. Se ha demostrado que en esta última existe un mayor número de anastomosis vasculares intraóseas y de vasos retinaculares (Perry y Hall, 2011).
- Edad: La enfermedad de Perthes suele acontecer en niños entre 2 y 12 años de edad, con un pico de frecuencia del 80% entre los 4 y los 8 años. Ello es debido a que en este intervalo de edad existe una mayor precariedad en la vascularización de la región epifisaria que se realiza en su casi totalidad a través de los vasos retinaculares y sus ramas terminales, la circulación metafisaria que es importante en niños menores de 4 años no garantiza el aporte vascular, dado que la fisis actúa como barrera entre la circulación metafisaria y la epifisaria y los vasos del ligamento redondo no aportan una contribución importante en esta edad ( Chung SM, 1976).
- Retraso en la edad ósea: Se ha demostrado un retraso en la edad ósea en niños diagnosticados de Perthes antes de los 5 años de edad que es de media de 1 año en niños y de 2 años en niñas (Fisher, 1972; Bohr, 1979). Esto ocasiona una hipotrofia relativa del núcleo de osificación de la cabeza femoral y una hipertrofia relativa del cartílago hialino que lo recubre, existiendo por lo tanto una mayor probabilidad de que los vasos se lesionen al atravesarlo (Little y Kim, 2011).

- Sexo: Es más frecuente en varones en una proporción de 5:1. Ello puede ser debido a la mayor actividad física de los niños ( Perry Dc y cols., 2011).
- Otras entidades patológicas: La enfermedad de Perthes, se asocia con mayor frecuencia a síndrome de Down, osteocondrosis, malformaciones de la columna vertebral (Makin y cols., 1992) y malformaciones genito-urinarias (Catterall A y cols.,1971) y con la disminución de los niveles de somatomedina (Weinstein SL, 2006).

### \* Traumatismo.

La teoría traumática como causa de la enfermedad de Perthes fue inicialmente sospechada y descrita por Legg en su artículo original. Numerosos autores han tratado de comprobarla experimentalmente; entre ellos: Trueta (Trueta J, 1968) , Caffey (Caffey J, 1968), Ferguson (Ferguson AB, 1978) y más recientemente Thompson y Salter (Salter y cols., 1984).

Más que un traumatismo único de alta energía podría tratarse de múltiples traumatismos de baja energía que tendrían lugar durante el desempeño de las actividades normales de un niño sano constitucionalmente predispuesto. De acuerdo con Ponseti (Ponseti y cols., 1983), se presume que esta interrupción ocurre, cuando los vasos retinaculares atraviesan la capa espesa de cartílago en el reborde del cartílago epifisiario. La sacudida brusca de este cartílago producido por la acción de un trauma, puede ser

suficiente para alterar la continuidad de los vasos, antes de que estos alcancen el núcleo epifisario.

Por arteriografía superselectiva se ha demostrado que la abducción brusca de la cadera disminuye el riego de la arteria circunfleja femoral medial y que si la abducción se combina con intrarrotación de la cadera, cesa el riego a través de la arteria epifisaria lateral (Atsumi y cols, 2000).

### \* Teoría de la doble interferencia circulatoria

Los trabajos experimentales llevados a cabo en perros por varios investigadores principalmente los realizados por Inoué y cols. del London Hospital (Inoué y cols., 1976), produciendo interrupciones de la suplenia vascular a la epífisis femoral superior, así como los estudios de biopsias de epífisis óseas femorales de niños con enfermedad de Legg-Calvé-Perthes llevados a cabo por Osaka y Mizuno en Japón y Freeman y Vernon-Roberts en Inglaterra ( Inoué y cols., 1976), tratan de demostrar que es necesario un doble accidente vascular consecutivo para que tenga lugar una verdadera enfermedad de Legg-Calvé-Perthes.

- Primer accidente vascular

Se produce por lesión de la arteria epifisaria lateral y conduce a una necrosis de toda la epífisis y de la capa profunda del cartílago articular así como un cese de la osificación endondral. La capa superficial del cartílago, continúa creciendo porque se nutre a expensas del líquido sinovial. La fase de

necrosis se sigue de una rápida revascularización por repermeabilización de los vasos primitivos y de una reosificación de todo el núcleo a excepción de su parte más apical. Si solo ocurre esta fase el niño permanece asintomático y la cadera cura con normalidad y no desarrolla deformidad.

- Segundo accidente vascular.

Acontece en la región más apical del núcleo cefálico en fase de reosificación en una región expuesta a cizallamiento por ser una zona donde confluyen fuerzas de tensión y compresión. En esta zona apical, existe una mayor fragilidad ósea motivada por un incremento del mineral cálcico lo cual se ha demostrado gracias a una técnica conocida como retrodispersión de imágenes electrónicas (Hofstaetter y cols., 2010). Esta región de la epífisis está irrigada por la arteria epifisaria central rama terminal de la arteria epifisaria lateral. La lesión de este vaso, se produciría por la acción de fuerzas mecánicas que actúan sobre la cabeza femoral como la carga ponderal y las fuerzas musculares. Estas fuerzas serían también determinantes de que ocurra una fractura subcondral, que a su vez aumentaría la lesión vascular. Como consecuencia de este segundo episodio isquémico se produce una necrosis parcial del núcleo que afecta a la región anterior superior y lateral de la epífisis. El área afectada estaría rodeada de hueso no isquémico. Se sigue de un proceso de revascularización, que es mucho más lento, debido a que los vasos primitivos están ocluidos por trabéculas de hueso muerto y por la invasión de

tejido fibroso. Existe irregularidad en la reparación ósea con un predominio de reabsorción ósea y una aposición ósea retrasada y disminuida lo cual determina que se altere la resistencia ósea. Esto conduce al desarrollo de la clínica y los cambios que caracterizan a la enfermedad de Perthes.

### **1.5. Alteraciones Anatomo-patológicas.**

Independientemente de la causa, la interrupción del suministro de sangre a la cabeza femoral, produciendo necrosis isquémica, que parece ser un evento patológico clave, dando lugar a los cambios estructurales y patológicos posteriores en la cabeza femoral. El cese del flujo vascular a la cabeza femoral se sigue de un proceso de revascularización, reosificación y remodelación que afecta al cartílago articular, a la epífisis, a la físis y a la metáfisis (Kim H, 2012; Kim H, 2010).

A nivel del cartílago articular se produce una necrosis de su capa profunda y un cese de la osificación encondral. Tras la revascularización, esta se reestablece pero puede aparecer deformidad de la cabeza femoral si no se realiza de forma circunferencial y simétrica. En la epífisis sobreviene una necrosis de los osteocitos y de la médula ósea seguida de un proceso de revascularización y reparación óseo que es patológico por existir un predominio de la reabsorción osteoclástica con una aposición ósea osteoblástica disminuida y retrasada. Esto conduce a una alteración de la

resistencia de la epífisis que puede llevar a su colapso y pérdida de esfericidad (Kim H, 2012; Kim H, 2010).

La fisis sufre una desorganización del cartílago de crecimiento y pérdida de la disposición columnar de los condrocitos con alteración de la osificación. Esta distorsión fisaria da lugar a la aparición de puentes fisarios y alteración del crecimiento del cuello femoral con posibilidad de aparición de una coxa vara y/o breve. En la metáfisis observamos un ensanchamiento por hiperaflujo vascular y presencia de áreas de fibrocartílago procedente de la fisis (quistes metafisarios) (Kim H, 2012; Kim H, 2010).

Finalmente se llega a una fase residual o de deformidad causada por una alteración de las propiedades mecánicas de la cadera que conducen a la aparición de las deformidades residuales. Autores como Catterall (Catterall A, 1971) opinan que es debida a que el hueso necrótico es reabsorbido y sustituido por un hueso nuevo, inmaduro y biológicamente poco resistente a las fuerzas deformantes como el peso corporal y las fuerzas que se ejercen a través de las articulaciones de la pelvis infantil (Suehiro M y cols., 2000).

En un estudio reciente realizado por Kim (Kim H, 2012) en animales de experimentación han demostrado que la deformidad de la cabeza femoral que acontece en el Perthes es debida a una falta de acoplamiento entre una reabsorción osteoclástica precoz y aumentada y una aposición ósea disminuida y retrasada. También se ha visto que la administración de sustancias inhibitoras de la función osteoclástica como los bifosfonatos y de

sustancias que potencian la actividad osteogénica como las BMP disminuyen la deformidad de la cabeza femoral (Little D y cols., 2011). Como consecuencia del hiperaflujo vascular que se produce tras la necrosis inicial se produce un ensachamiento metafisario y una cabeza magna. Debido a la alteración de las propiedades mecánicas y biológicas, la cabeza femoral puede sufrir un colapso y pérdida de esfericidad desarrollándose una cabeza ovoidea que puede progresar a una coxa plana. El colapso de la cabeza lleva también a una extrusión lateral de la misma. La región de la cabeza femoral extruida sigue creciendo, el reborde acetabular causa un pinzamiento de la misma que es mayor durante el movimiento de abducción. Esta condición conduce a una deformidad estructurada conocida como cadera en bisagra. La lesión de la fisis del cuello femoral provoca el desarrollo de una coxa breve y en ocasiones vara. El trocánter mayor, continúa creciendo a través de su fisis y de su apófisis que no han sido dañadas, esto provoca una hipertrofia relativa del trocánter mayor y una insuficiencia glútea. Los cambios acetabulares, son secundarios a los cambios femorales y debidos a la capacidad de remodelado del acetábulo infantil. Este, se ensancha para adaptarse a la cabeza femoral pero no aumenta de profundidad. Estas deformidades y la incongruencia articular femoro-acetabular conducen a la aparición de una coxartrosis precoz en el adulto joven (Kim H, 2011).

## **1.6. Clínica**

El síntoma de presentación más frecuente es una cojera indolora durante un período variable. El dolor, si está presente, suele estar relacionado con la actividad y se puede localizar en la ingle, la región anterior del muslo o en la rodilla. De forma menos frecuente, el comienzo puede ser mucho más agudo y se puede asociar con imposibilidad para caminar.

En el examen físico, se puede observar marcha antiálgica o de Trendelenburg. Por lo general, hay una limitación de la rotación interna y la abducción de la cadera. También puede haber una leve contractura en flexión de la cadera, de 10 a 20°. La atrofia de los músculos del muslo, la pantorrilla o la nalga puede ser evidente. Se podría observar una aparente desigualdad de la longitud de los miembros inferiores, debido a una contractura en aducción o a verdadero acortamiento del lado comprometido por colapso de la cabeza femoral.

El diagnóstico diferencial durante la evaluación inicial incluye etiologías inflamatorias o infecciosas, como sinovitis transitoria de cadera, artritis séptica o artritis juvenil. Otras causas conocidas de osteonecrosis son anemia drepanocítica, talasemia, hemofilia, púrpura trombocitopénica idiopática, leucemia y enfermedad de Gaucher. En casos bilaterales simétricos, corresponde considerar una displasia esquelética, como displasia múltiple o espondiloepifisaria.

### **1.7. Clasificación de la Enfermedad de Perthes.**

Existen en la literatura multitud de clasificaciones aplicadas a la enfermedad de Legg-Calvé- Perthes.

Hay clasificaciones realizadas sobre las características del paciente, englobando aquellas que se realizan sobre factores de género, factores de tipo étnico o racial del sujeto. Igualmente se incluirían aquellas clasificaciones realizadas sobre factores sociales o económicos así como aquellas realizadas sobre la bilateralidad de la enfermedad o la sincronidad de su desarrollo sin embargo la clasificación basada sobre las características del paciente en la enfermedad de Perthes más significativa es aquella realizada sobre la edad del niño, agrupándose tradicionalmente en 2 grupos: menores de 6 años, tienen buen pronóstico y mayores de 6 años tienen mal pronóstico. Esto podría ser debido a que cuanto más pequeño sea el niño de más tiempo dispondría para para la remodelación de cualquier deformidad de la cabeza del fémur. Ippolito y cols (Ippolito y cols, 1987) estudiaron de 61 niños con enfermedad de Perthes y afectación unilateral. La edad media al diagnóstico fue de 7 años 5 meses y en el seguimiento fue de 32 años, un intervalo promedio de 25 años. Encontraron tres grupos de edad de los pacientes para realizar diferente pronóstico a largo plazo (basándose en la clasificación de Catterall y Stulberg que describiremos a continuación). Los menores de cinco años de edad al momento del diagnóstico mostró una correlación estadísticamente significativa entre el grupo de Catterall y clases

Stulberg I y II. Los pacientes de entre cinco y nueve años de edad al momento del diagnóstico mostraron una correlación significativa entre el grupo de Catterall y Clases Stulberg I, II, III y IV, mientras que en los pacientes diagnosticados después de nueve años de edad no hubo correlación estadística entre el grupo de Catterall y clase Stulberg, teniendo todos un mal pronóstico y acabar en clases Stulberg III, IV y V.

En segundo lugar están las clasificaciones según la fase cronológica en la que se encuentra la enfermedad, entre ellas la más conocida es la clasificación de Waldenström (Waldenström H, 1922). Define los grupos o fases en base a las alteraciones anatomopatológicas y su repercusión radiológica en la cabeza femoral:

- Fase I: esclerótica o condensación: Es el estadio inicial de necrosis avascular. Se caracteriza por un aumento de la densidad epifisaria, un núcleo de osificación más pequeño y ensanchamiento del espacio articular medial. Se producen por detención de la osificación endocondral por la isquemia e hipertrofia del cartílago articular.
- Fase II: Fragmentación o reabsorción: el hueso necrosado comienza reabsorberse. El núcleo de osificación aparentemente está fragmentado por la presencia de áreas radiolúcidas (reabsorción de hueso necrótico) junto a zonas radioopacas o densas. Un signo precoz también es la “fractura subcondral o crescent sign”, línea radiolúcida semilunar subcondral que se extiende en la epífisis desde

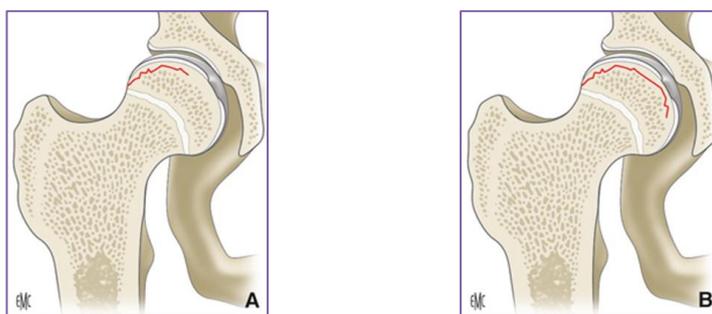
anterior a posterior y de fuera a dentro, en longitud variable. Su longitud determina la extensión del área de necrosis. Donde mejor se ve es en la proyección axial. Está presente en un 25% de los casos.

- Fase III: Reparación o reosificación: comienza el proceso de curación. Desaparición gradual de las zonas radiolúcidas, recuperando el núcleo de osificación una densidad homogénea normal.
- Fase IV: Residual: con recuperación de la densidad ósea normal con o sin la aparición de deformidades en la cabeza.

En tercer lugar se encuentran aquellas clasificaciones, en función de la severidad de la enfermedad que inciden sobre aspectos relacionados con la extensión o las alteraciones morfológicas de la cabeza femoral, pudiendo realizarse en diferentes estadios de la enfermedad. Entre ellas las más conocidas son la clasificación de Caterall (Catterall, 1971), la clasificación de Salter y Thompson (Salter RB, Thompson GH, 1984), la clasificación de Herring (Herring JA y cols., 1992), la de Mose (Mose K, 1980) o la clasificación de Stulberg (Stulberg y cols., 1981).

En 1984 Salter y Thompson (Salter RB, Thompson GH, 1984), realizan su clasificación que se basa en la presencia de la fractura subcondral en la proyección axial (figura1.2). Debido a que la fractura subcondral se puede observar en la etapa de fragmentación temprana de la enfermedad, tiene valor pronóstico. Define un tipo A en el que la fractura subcondral abarca menos del 50% de la anchura de epífisis y se asocia a un pronóstico

favorable y un tipo B en el que la fractura alcanza más de la mitad de la epífisis e indica mayor extensión de la enfermedad y por tanto peor pronóstico. Es simple y puede utilizarse precozmente, aunque presenta la desventaja de basarse en la fractura subcondral, que sólo está presente en el 30% de los casos.



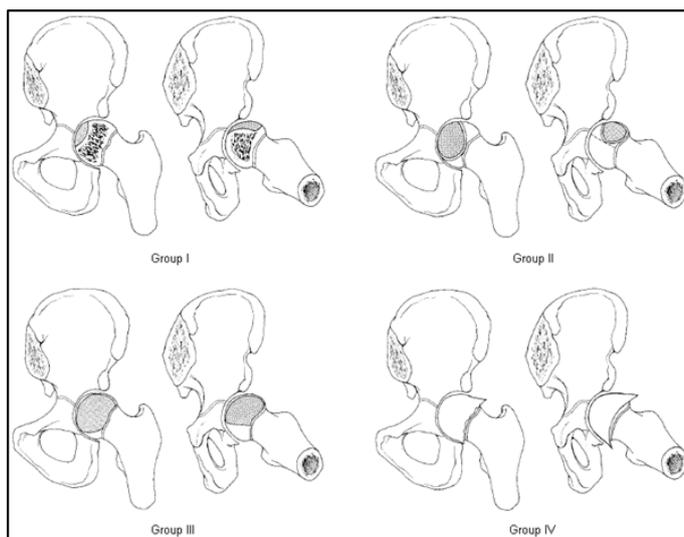
*Figura 1.2. Clasificación de Salter y Thompson. Fuente: Laville JM. EMC: Enfermedad de Legg-Perthes-Calvé. Aparato locomotor. 2010; 43(3): 1-10.*

En 1971 A. Catterall (Catterall, 1971) describe la primera de las grandes clasificaciones de extensión en la enfermedad de Perthes (figuras.1.3 y 1.4). Esta clasificación se realiza sobre proyecciones anteroposteriores y axiales de la cabeza femoral afectada en la fase de fragmentación tardía describiendo cuatro grados.

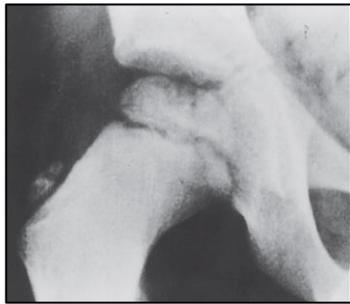
- El Grado I: presenta un grado de afectación menor al 25% de la cabeza femoral, especialmente en la zona anterior de la misma. No presenta alteración metafisiaria, colapso o secuestro asociado.

- El Grado II: presenta una afectación superior al 50% con repercusión en la zona anterior y central de la cabeza femoral. Presenta una alteración metafisiaria limitada sin colapso de la cabeza o con un colapso mínimo y sin secuestros.
- El Grado III: presenta una alteración que puede alcanzar el 75% de la cabeza femoral preservando únicamente la zona más lateral de la cabeza. Presenta una alteración metafisiaria difusa con existencia de colapsos y secuestros asociados.
- El Grado IV: presenta una lesión que implica el 100% de la cabeza femoral con una alteración metafisiaria severa y colapso importante de la misma.

Esta clasificación tiene valor pronóstico. Los grados I y II tienen buen pronóstico y los grados III y IV mal pronóstico.



*Figura.1.3. Clasificación de Catterall. Fuente: Skaggs DL, Tolo VT: Legg-Calve-Perthes disease. J Am Acad Orthop Surg. 1996; 4:9-16.*



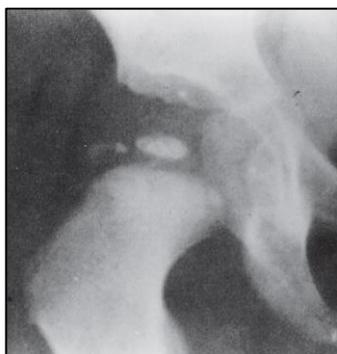
Grado I



Grado II



Grado III



Grado IV

*Figura.1.4. Clasificación de Catterall. Fuente: Catterall A: The natural history of Perthes' disease, J Bone Joint Surg Br 53:37, 1971.*

En el año 1992, Herring y colaboradores (Herring JA y cols., 1992), definen una de las más conocidas clasificaciones de extensión de la enfermedad de Perthes. Se basa en la integridad o no del “pilar lateral o externo” de la cabeza en radiografía A.P, durante la fase de fragmentación, comparándolo con la cabeza contralateral sana. El pilar lateral ocupa del 15% al 30% externo de la anchura de la cabeza (el central el 50% y el medial el 20 a 35%).

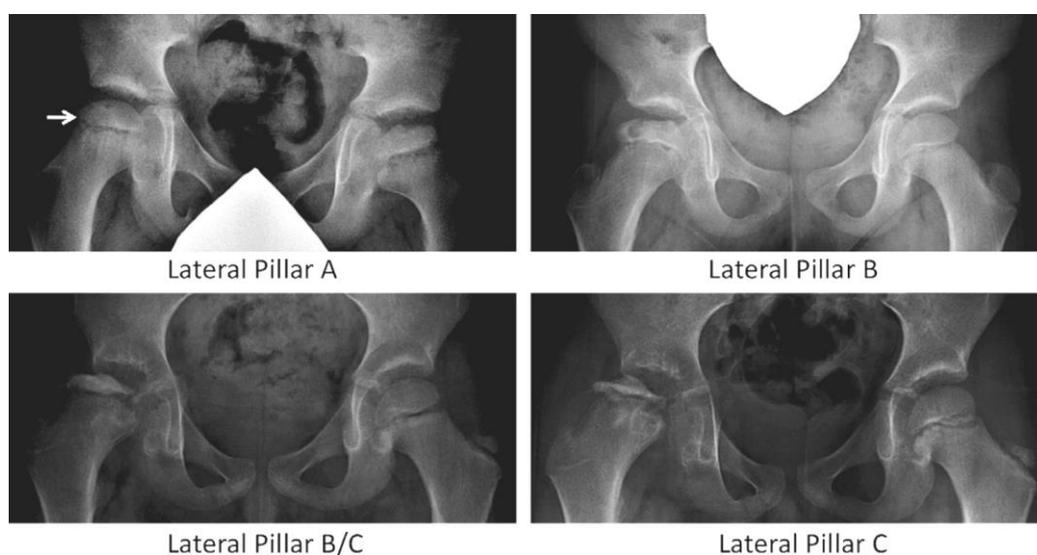
De este modo define tres grupos:

- Grupo A: no hay afectación del pilar lateral, ni cambios de densidad en el mismo o pérdida de altura.
- Grupo B: el pilar lateral presenta una radiolucencia en con una pérdida de altura que no excede del 50%.
- Grupo C: que presenta una mayor radiolucencia del pilar lateral con una pérdida de altura superior al 50%.

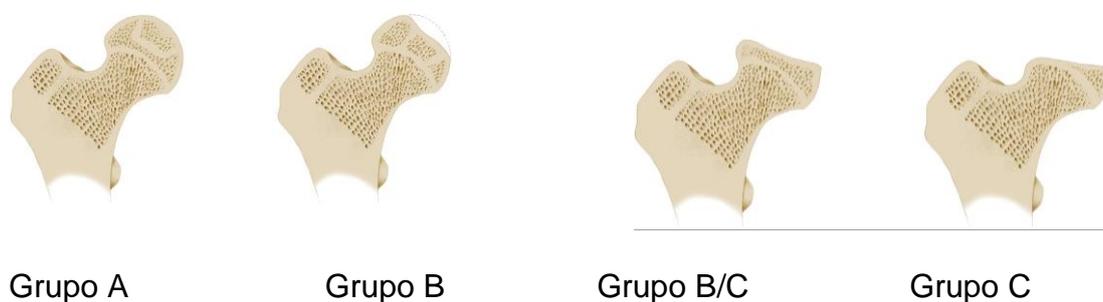
El propio Herring en el año 2004 (Herring JA y cols., 2004) realiza una modificación de la clasificación añadiendo un grupo intermedio que define como un grupo B/C que presentaría como características específicas un pilar lateral estrecho de entre 2 y 3 milímetros de anchura pero superior al 50% de la altura de la cadera contralateral o bien un pilar lateral con poca osificación pero al menos con el 50% de la altura respecto a la cadera contralateral. Igualmente clasifica en este grupo aquellos pilares externos

con un 50% de la altura pero hundido en relación al pilar central (sin colapso central) (figuras 1.5 y 1.6)

Esta clasificación tiene también valor pronóstico. El grupo A tiene buen pronóstico, el grupo C tiene mal pronóstico y el grupo B y B/C pronóstico intermedio.



*Figura 1.5. Clasificación de Herring. Fuente: Kim H, Herring JA. Pathophysiology, Classifications, and Natural History of Perthes Disease. Orthop Clin N Am. 2011;42: 285–95.*



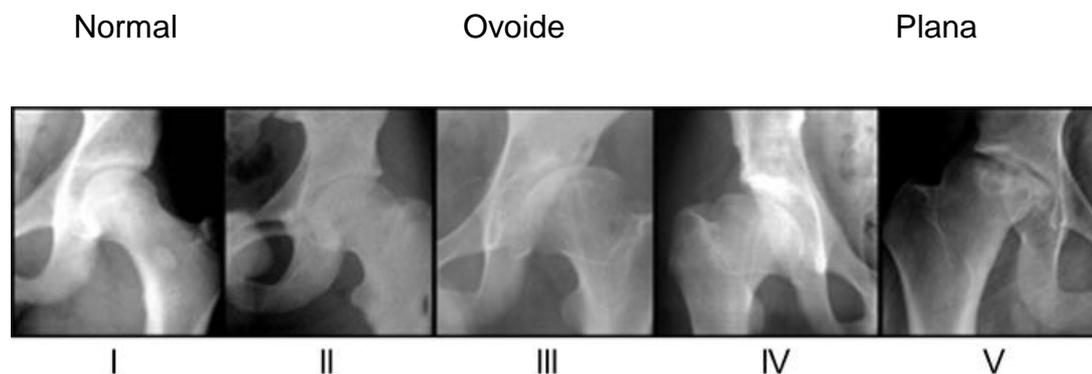
*Figura 1.6. Clasificación de Herring. Fuente: Kim H, Herring JA. Legg-Calve-Perthes disease. En: Herring J. Tachdjian's. Pediatric Orthopaedics. 5<sup>th</sup> Edition. Texas: Elsevier; 2014.580-629.*

En 1981 S. Stulberg (Stulberg y cols., 1981) define la que será utilizada como clasificación de resultados más habitual (figura.1.7). Esta clasificación, que se realiza en fase de curación, es la que presenta mayor utilidad a la hora de evaluar las secuelas de la enfermedad de Perthes. Según el grado de deformidad de la cadera la evolución hacia la coxartrosis será más o menos evidente. Define cinco grupos o clases distinguiendo como *clase I* aquellas caderas en las que no se aprecia diferencia con la cadera normal, *clase II* aquellas caderas que presentan una discrepancia menor a 2 mm en relación a la cadera normal, *clase III* aquellas cabezas femorales ovoideas que discrepan en más de 2 mm de la cabeza femoral sana, *clase IV* aquellas cabezas femorales que presentan al menos 1 cm de aplanamiento en el área de carga de la cabeza femoral y *clase V* aquellas cabezas con colapso femoral generalmente central presentando cuello y acetábulos normales.

Las caderas clase 1 y 2 son esféricas y congruentes, con buen pronóstico a largo plazo. Las caderas clase 3 y 4 son anesféricas y congruentes con un pronóstico a largo plazo intermedio y las caderas clase 5 son completamente anesféricas e incongruentes con un riesgo elevado de artrosis precoz.

Esta clasificación presenta para autores como Neyt (Neyt y cols., 1999) problemas en la definición específica de los grupos, habiendo llevado esta situación a la simplificación de la clasificación en dos únicos grupo diferenciándose en aquellos grupos con cabeza esférica (grupos I, II ), de

buen pronóstico y aquellos grupos con cabeza no esférica (III,IV y V) de mal pronóstico.



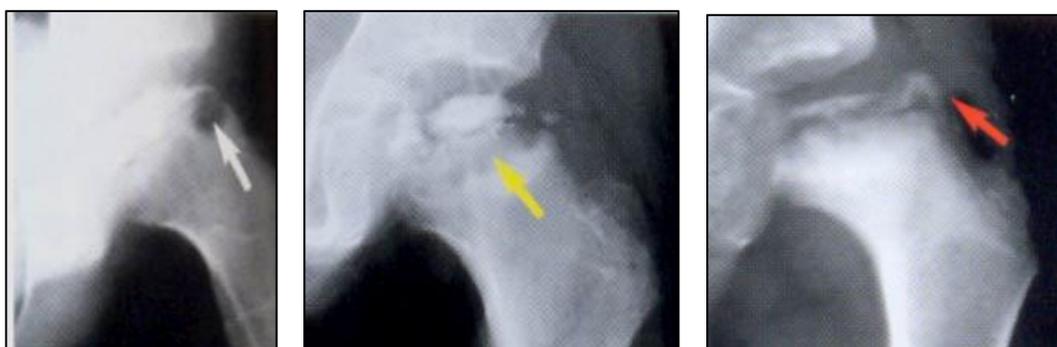
*Figura. 1.7. Clasificación de Stulberg. Fuente: página web del Hospital Scottish Rite for children de Texas. Disponible en: [www.tsrhc.org/Perthes disease](http://www.tsrhc.org/Perthes%20disease).*

### **1.8. Historia natural y factores de riesgo.**

La enfermedad de Perthes sigue un curso autolimitado y únicamente habría que tratar a aquellos pacientes que presente un riesgo elevado de desarrollar una cadera incongruente. Por ello se han identificado una serie de factores de riesgo que permiten identificar esos casos:

- Edad al comienzo de la enfermedad. A menor edad de inicio, mejor resultado a largo plazo. La edad crítica se establece a los 6 años, niños > 6 años tiene peores resultados porque la capacidad de remodelación es menor (Herring HA y cols., 2004).

- Extensión de la afectación epifisaria. A mayor extensión de la lesión epifisaria mayor probabilidad de colapso y deformidad, y peores resultados a largo plazo (artrosis precoz). Los estadios III y IV de Catterall, el grupo B de la clasificación de Salter y el grupo C de la clasificación de Herring, se asocian a un peor pronóstico.
- Signos de cabeza de riesgo, descritos por Catterall (Catterall A, 1971): calcificación lateral de la epífisis, horizontalización de la fisis, subluxación lateral de la cabeza femoral, signo de Gage o zona osteolítica lateral metafisoepifisaria y radiolucencia metafisaria. Su presencia avisa sobre mala evolución y deformidad epifisaria, con malos resultados y degeneración articular precoz. (figura 1.8)
- Contractura en aducción y/o flexión de la cadera que si son mantenidas limitan la movilidad y pueden condicionar la subluxación lateral (Grzegorzewsky A y cols., 2006).



Signo de Gage

Radiolucencia metafisaria.  
Calcificación lateral.

Subluxación lateral y  
fisis horizontal.

*Figura.1.8.Signos de cabeza de riesgo. Fuente:Enfermedad de Legg-Calve-Perthes. En: Staheli L. Ortopedia Pediátrica.1ª edición. Madrid: Marban;2003.146-151.*

## **1.9. Tratamiento**

El objetivo del tratamiento en la enfermedad de Perthes es prevenir o minimizar la deformidad en la cabeza femoral, manteniendo una cadera congruente, contenida y completamente móvil (Joseph B y cols., 2011)

Debemos de tener en mente 2 principios:

1. Mantener la movilidad: la restricción de la movilidad en estos pacientes es debido inicialmente a la sinovitis de la cadera que ocasiona contractura de los músculos aductores y psoas.

Existen diferentes métodos para mantener la movilidad articular que van desde el reposo en cama hasta la fisioterapia (Carney BT y cols.,2004; Terjesen T y cols.,2010)

Es primordial restaurar la movilidad pues nos va a permitir abducir la cadera y colocar la porción anterolateral de la cabeza femoral en el acetábulo, en posición de contención. Esto se debe conseguir antes de instaurar cualquier tratamiento, sea quirúrgico u ortopédico.

2. “Contención”: consiste en matener la cabeza femoral dentro del acetábulo, impidiendo su luxación y deformidad. El acetábulo actúa de model para contener una cabeza una cabeza en el estadio biológicamente plástico del proceso (cuándo esta es vulnerable a la deformidad y mientras dura el proceso de renegeración), manteniendo su forma esférica o remodelandola si se ha deformado.

Para que el tratamiento sea efectivo debe iniciarse en la fase inicial o de fragmentación ( Joseph B y cols., 2003), que es cuando la cabeza tiene aún capacidad plástica.

La contención puede hacerse de forma ortopédica o quirúrgica.

### Contención ortopédica:

Se han utilizado muchos tipos de ortesis pero todas ellas aseguraban la contención mediante la abducción de la cadera: ortesis que limitaban la carga, ortesis que permitían la carga pero limitaban la movilidad y aparatos que permitían la carga y cierto grado de movilidad manteniendo una abducción fija, como la ortesis Scottish Rite (Price CT y cols., 2011).

Sin embargo, en los últimos años se ha puesto en duda su eficacia y actualmente se tiende a desaconsejar su uso (Herring HA y cols., 2004; Wiig O y cols.,2008).

### Contención quirúrgica:

La contención quirúrgica se puede conseguir recolocando la cabeza del fémur en el acetábulo mediante una osteotomía varizante femoral (OVF) o redireccionando el acetábulo mediante una osteotomía pélvica (Salter, Shelf, triple osteotomía pélvica), o bien combinando ambas (OVF y Salter) (Price CT y cols., 2011).

Hoy en día, se investiga con tratamientos biológicos que tienen su base en las alteraciones anatomopatológicas sufridas por la cabeza durante el curso

de la enfermedad. Como ya vimos al hablar de la anatomía patológica de la enfermedad, la deformidad de la cabeza femoral que acontece en el Perthes es debida a una falta de acoplamiento entre una reabsorción osteoclástica precoz y aumentada y una aposición ósea disminuida y retrasada de ahí que se esté investigando si la administración de sustancias inhibidoras de la función osteoclástica, como lo bifosfonatos, y de sustancias que potencian la actividad osteogénica, como las BMP, disminuyen la deformidad de la cabeza femoral (Little D y cols.,2011; Kim H, 2012).

## Justificación y Objetivos

## **2. Justificación y Objetivos**

La enfermedad de Legg-Perthes-Calvé es un proceso patológico que afecta al desarrollo de la cadera del niño. Aunque sabemos que se produce por necrosis aséptica de la cabeza femoral, las causas que originan tal necrosis se desconocen realmente. Una de las hipótesis aún en discusión es la de una pérdida de vascularización por fenómenos trombóticos, lo que nos ha motivado a investigar posibles alteraciones genéticas protrombóticas que afectan la regulación de la cascada de la coagulación. Existen controversias acerca de la relación de las anomalías genéticas asociadas a la trombofilia y la etiopatogenia de la enfermedad de Perthes y apenas hay estudios que traten su implicación en la gravedad de dicha enfermedad.

Para el estudio de variables epidemiológicas asociadas a enfermedades relativamente poco prevalentes como la enfermedad de Perthes, en los que se eviten elementos de confusión derivados de la selección de la muestra, la comunidad autónoma de Cantabria cuenta ventajas determinantes. La unidad de Ortopedia Infantil del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla es responsable del seguimiento de todos los niños y adolescentes diagnosticados de enfermedad de Perthes y cuenta con la ventaja de utilizar criterios diagnósticos y de seguimiento uniformes, lo que brinda homogeneidad a la muestra a la hora de identificar factores ligados a la patogenia de esta enfermedad.

Este trabajo se ha diseñado con el fin de estudiar si determinados factores genéticos ligados a trombofilia hereditaria están relacionados con la gravedad de la enfermedad de Perthes. El fin último del estudio pretende reconocer si existen factores predisponentes ligados a la gravedad en la enfermedad de Perthes que nos puedan ayudar a tomar decisiones terapéuticas en las fases iniciales de la enfermedad.

A los estudios realizados por otros autores en relación con la trombofilia hereditaria, (mutación G1619A del factor V, mutación G20210 de la protrombina y mutación C677T para la metilentetrahidrofolato reductasa), y que ya en algunos casos han demostrado su relación con diversos procesos protrombóticos, añadimos la caracterización para el polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa. Esta última variante genética es más prevalente en pacientes con mayor daño tisular tras mecanismos de isquemia y está implicada en mecanismos de remodelado tisular.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la presencia de alguno de los polimorfismos estudiados estén implicados en la gravedad de la enfermedad de Perthes y pueda ser predictor de mala evolución.

### 2.1. Objetivos

#### 2.1.1 Objetivo principal

Analizar si la mutación G1691A para el Factor V, la mutación G20210A del gen de la protrombina, la mutación C677T del gen para la

metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y la presencia de la variante mutada PIA<sup>2</sup> del gen para la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa están implicados en el curso clínico de la enfermedad de Perthes, particularmente en las formas más severas (Catterall III y IV).

### **2.1.2. Objetivos secundarios**

2.1.2.1 Analizar las características epidemiológicas de la enfermedad de Perthes en Cantabria.

2.1.2.2 Analizar la prevalencia de distintas anomalías genéticas asociadas a trombofilia en nuestra población afecta de enfermedad de Perthes, comparándola con la prevalencia en la población general.

2.1.2.3 Analizar la prevalencia del polimorfismo PIA<sup>2</sup> del gen para la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en nuestra población afecta de enfermedad de Perthes, comparándola con la prevalencia en la población general.

2.1.2.4 Analizar si diferentes haplotipos genéticos de diversas proteínas relacionadas con mecanismos de trombosis, reparación tisular y alteraciones en el remodelado de la matriz extracelular (la mutación C677T para la MTHFR y el polimorfismo PIA<sup>2</sup> del gen para la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa), podrían influir en el curso clínico de la enfermedad de Perthes.

## Material y métodos

### **3. Material y métodos**

#### **3.1. Pacientes**

Se realizó un estudio de cohortes, incluyendo a 41 niños diagnosticados de enfermedad de Perthes en la Unidad de Ortopedia Infantil del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre enero de 1996 y diciembre de 2014. Todos presentaron características clínicas y radiológicas de enfermedad de Perthes. Se recogió la edad a la que se diagnosticó la enfermedad y la severidad según la clasificación de Catterall, si habían precisado o no cirugía, si la afectación era unilateral o bilateral y el resultado final según la clasificación de Stulberg ( Anexo I ). En 10 de ellos, la participación fue bilateral, representando un total de 51 caderas.

La presencia de otras causas de osteonecrosis fue motivo de exclusión: uso de esteroides, hipotiroidismo, displasia epifisaria, enfermedad ósea metabólica, enfermedad de células falciforme, lupus, fractura de cadera, artritis séptica.

Ninguno de los pacientes tenía evidencia clínica o familiar de enfermedades vasculares significativas, como aterosclerosis grave, trombosis arterial, enfermedad coronaria, hipertensión, enfermedades renales, cardiopatías isquémicas, enfermedades cerebrovasculares o trastornos coexistentes que pudieran asociarse a los polimorfismos analizados.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes individuales (de sus padres o tutores) de acuerdo con los criterios de la Declaración de Helsinki, una declaración de principios éticos para la investigación médica con sujetos humanos, incluida la investigación sobre material y datos humanos identificables. El estudio ha sido supervisado y aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario y Universitario de autores (CEIC-C: Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria), (Anexo II). Después de obtener el consentimiento informado de los padres de todos los pacientes, se extrajo una muestra de sangre para el análisis de ADN. Las técnicas de análisis molecular se llevaron a cabo en el Laboratorio de Pediatría del Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas de Facultad de Medicina de Santander.

### **3.2. Controles**

Se utilizó un grupo control de 118 individuos sanos, sin historia previa de tromboembolismo, y representativos de la población general de nuestra región, cuyas muestras de sangre se obtuvieron tras consentimiento informado para el estudio AVENA (estudio de hábitos nutricionales y de estilo de vida relacionados con riesgo cardiovascular financiado por el FIS años 2002-2005 y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria (CEIC-C)) (Anexo III).

La población control, ajustada en edad y sexo a la población de pacientes, se utiliza como referencia de la prevalencia de cada uno de los polimorfismos en nuestra población y se corresponde con los resultados obtenidos en estudios más amplios llevados a cabo en nuestro entorno.

### **3.3 Análisis genético**

#### **3.3.1 Extracción del DNA**

A los participantes en el estudio, se les extrajo una muestra de 2 ml de sangre periférica en tubos con EDTA como anticoagulante, a partir de los cuales se realizó la purificación de DNA genómico mediante el método modificado de Higuchi (1989). El DNA obtenido se congeló a -20°C hasta su posterior análisis.

Posteriormente, se realizó el estudio de los polimorfismos genéticos analizados mediante amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Análisis de los Fragmentos de Restricción (RFLP) obtenidos tras digestión con el enzima de restricción correspondiente, siguiendo los protocolos descritos a continuación.

### **3.3.2 Determinación del polimorfismo PIA<sup>2</sup> del gen de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.**

El análisis del polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la Glicoproteína Plaquetaria IIIa/IIb (rs5918) se realiza siguiendo el protocolo descrito por Weiss y colaboradores (Weiss et al., 1996), con ligeras modificaciones.

Se realiza una amplificación de DNA a partir de los siguientes cebadores:

G3P Up: 5' TTC TGA TTG CTG GAC TTC TCT T 3'

G3P Down: 5' TCT CTC CCC ATG GCA AAG AGT 3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µL que contenía: 3 µL de ADN genómico, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de mezcla de dNTP, 0,8 µM de cada cebador, 10% de DMSO (Sigma, Sant Louis, MO, EE.UU.) y 2U de Taq polimerasa (BioTaq polimerasa, Bio-Line, Londres, Reino Unido), utilizando un termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, EE.UU.). La amplificación consistió en una desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 38 ciclos consistentes en desnaturalización (94°C, 1 min y 30 sg), hibridación (59°C, 2 min), y extensión (72°C, 1 min y 30 sg); y una extensión final (72°C, 10 min). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa de baja electroendosmosis D-1 (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 1.5% para verificar la correcta amplificación del fragmento de 267 pb.

## **Material y métodos**

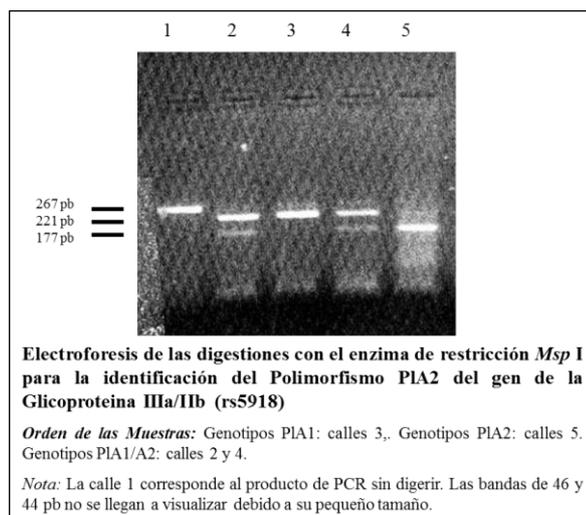
El producto amplificado se digiere con el enzima de restricción *Msp* I (Invitrogen, USA) a 37°C durante 4 h. A continuación, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa MS-12 (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 3% con buffer Tris-borato EDTA (89 mM Tris-borato, EDTA 2 mM) (Serva, Heidelberg, Alemania) y se visualizaron los fragmentos bajo luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio (10 mg / ml) (Serva, Heidelberg, Alemania).

Las muestras se genotipan de acuerdo con los tamaños que presenten los fragmentos visualizados de la siguiente manera: (figura 3.1)

Genotipo Normal (PIA1) = 221 y 46 pb

Genotipo Mutado (PIA2) = 177, 46 y 44 pb

Genotipo Heterocigoto (PIA1/A2) = 221, 177, 46 y 44 pb.



**Figura 3.1.** Determinación del polimorfismo PIA<sup>2</sup> del gen de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.

### **3.3.3 Determinación del polimorfismo C677T del gen la metilentetrahidrofolato reductasa.**

El análisis del polimorfismo MTHFR C677T (rs1801133) se realizó también mediante amplificación por PCR y digestión con enzimas de restricción, siguiendo la técnica descrita por Frosst y colaboradores (Frosst et al., 1995).

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Primer sense: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA -3 '(exónico)

Primer antisense 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3 '(intrónico)

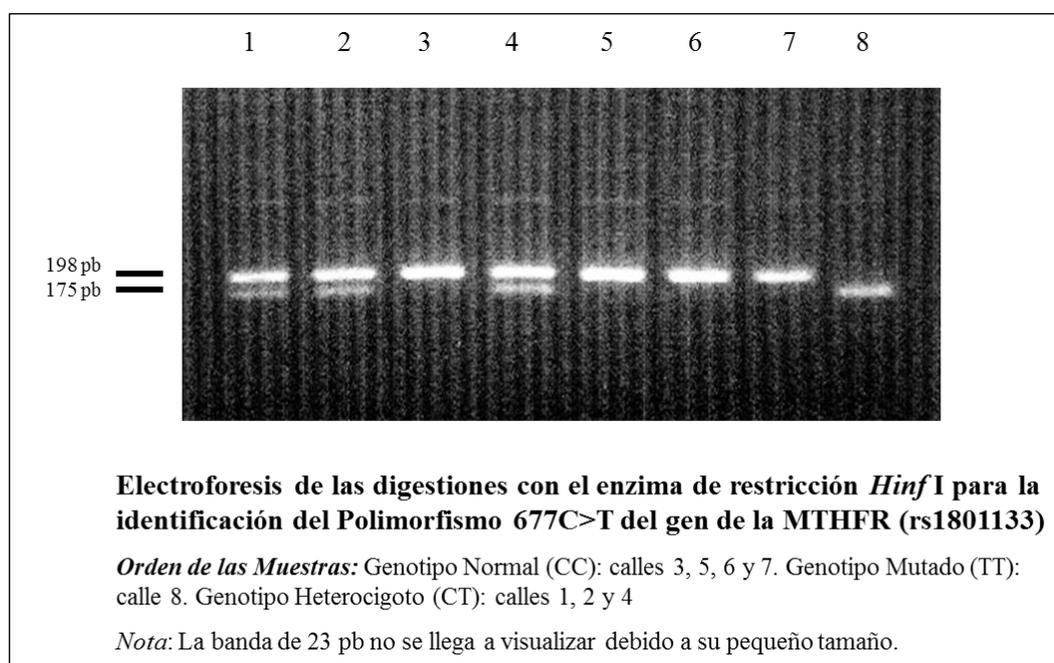
La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µL que contenía: 3 µL de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de mezcla de dNTP, 0,5 µM de cada cebador, 10% de DMSO (Sigma, Sant Louis, MO, EE.UU.) y 2U de Taq polimerasa (BioTaq polimerasa, Bio-Line, Londres, Reino Unido), utilizando un termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, EE.UU.). La amplificación consistió en una desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 38 ciclos consistentes en desnaturalización (94°C, 1 min), hibridación (55°C, 45 sg), y extensión (72°C, 1 min); y una extensión final (72°C, 10 min).

Una vez verificada la correcta amplificación del fragmento de 198 pb, mediante electroforesis en gel de agarosa de baja electroendosmosis D-1 (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 1.5%, se procedió a digerirlo con el

## **Material y métodos**

enzima de restricción Hinf I (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) a 37°C durante 4 h. A continuación, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa MS-12 (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 3% con buffer Tris-borato EDTA (89 mM Tris-borato, EDTA 2 mM) (Serva, Heidelberg, Alemania) y se visualizaron los fragmentos bajo luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio (10 mg / ml) (Serva, Heidelberg, Alemania).

Dicha digestión da lugar a fragmentos de los siguientes tamaños: 198 pb en los homocigotos 677C; 198, 175 y 23 pb en los heterocigotos 677CT; y 175 y 23 pb en los homocigotos 677TT (figura 3.2)



*Figura 3.2. Determinación del polimorfismo C677T de la MTHFR.*

### **3.3.4 Determinación del polimorfismo G1691A del gen del Factor V de Leiden.**

El análisis del polimorfismo G1691A del Factor V de Leiden (rs6025) se realizó mediante las mismas técnicas, siguiendo en este caso, el método descrito por Bertina y colaboradores (Bertina et al., 1994).

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Primer sense: 5'-TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC A -3 '

Primer antisense 5'-TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA -3 '

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µL que contenía: 3 µL de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 120 µM de mezcla de dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 4% de DMSO (Sigma, Sant Louis, MO, EE.UU.) y 2U de Taq polimerasa (BioTaq polimerasa, Bio-Line, Londres, Reino Unido), utilizando un termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, EE.UU.). La amplificación consistió en una desnaturalización inicial (95°C, 5 min); 38 ciclos consistentes en desnaturalización (94°C, 1 min), hibridación (53°C, 1 min), y extensión (72°C, 1 min y 30 sg); y una extensión final (72°C, 7 min). Al finalizar, se comprobó la correcta amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa de baja electroendosmosis D-1 (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 1,5%.

## **Material y métodos**

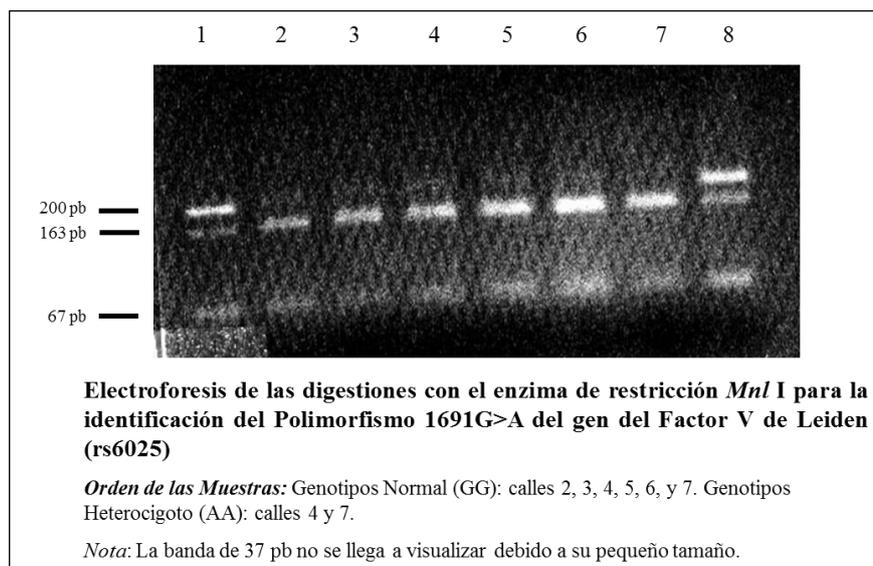
El producto amplificado de 267 pb se digiere con el enzima de restricción *Mml* I (New England Biolabs, USA) a 37°C durante 4 h. A continuación, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa MS-12 (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 3% con buffer Tris-borato EDTA (89 mM Tris-borato, EDTA 2 mM) (Serva, Heidelberg, Alemania) y se visualizaron los fragmentos bajo luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio (10 mg / ml) (Serva, Heidelberg, Alemania).

Las muestras se genotipan de acuerdo a los tamaños que presenten los fragmentos visualizados de la siguiente manera: (figura 3.3)

Genotipo Normal (1691GG) = 163, 67 y 37 pb

Genotipo Mutado (1691AA) = 200 y 67 pb

Genotipo Heterocigoto (1691GA) = 200, 163, 67 y 37 pb.



**Figura 3.3. Determinación del polimorfismo G1691A del gen del factor V Leiden.**

### **3.3.5 Determinación del polimorfismo G20210A del gen de la protrombina.**

El estudio del polimorfismo 20210G>A de la Protrombina (rs1799963) también se analizó mediante las técnicas de PCR y digestión con enzima de restricción siguiendo el método descrito por Poort y colaboradores (Poort et al., 1996).

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Primer Up: 5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC -3 '

Primer Down: 5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG AA\*G C -3 '

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µL que contenía: 3 µL de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 120 µM de mezcla de dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 4% de DMSO (Sigma, Sant Louis, MO, EEUU) y 2U de Taq polimerasa (BioTaq polimerasa, Bio-Line, Londres, Reino Unido), utilizando un termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, EE.UU.). La amplificación consistió en una desnaturalización inicial (95°C, 5 min); 38 ciclos consistentes en desnaturalización (94°C, 1 min), hibridación (50°C, 45 sg), y extensión (72°C, 45 sg); y una extensión final (72°C, 7 min). Al finalizar, se comprobó la correcta amplificación mediante electroforesis en gel de

## **Material y métodos**

agarosa de baja electroendosmosis D-1 (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 1,5%.

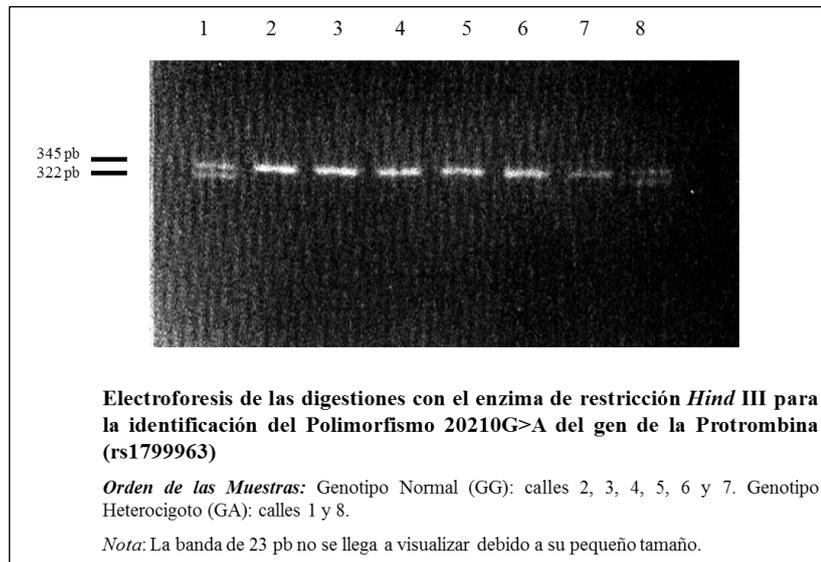
El producto amplificado de 345 pb se digiere con el enzima de restricción Hind III (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) a 37°C durante 4 h. A continuación, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa MS-12 (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 3% con buffer Tris-borato EDTA (89 mM Tris-borato, EDTA 2 mM) (Serva, Heidelberg, Alemania) y se visualizaron los fragmentos bajo luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio (10 mg / ml) (Serva, Heidelberg, Alemania).

En el primer Down se modifica la secuencia, sustituyendo el nucleótido marcado con un asterisco para forzar el punto de corte del enzima de restricción, por lo que las muestras se genotipan de acuerdo con los siguientes tamaños: (figura 3.4)

Genotipo Normal (20210GG) = 345 pb

Genotipo Mutado (20210AA) = 322 y 23 pb

Genotipo Heterocigoto (20210GA) = 345, 322 y 23 pb.



*Figura 3.4. Determinación del polimorfismo G20210A del gen de la protrombina.*

### **3.4. Análisis estadístico**

Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar, y las variables categóricas como valores absolutos y porcentajes (%). Cada polimorfismo fue descrito estadísticamente, estimando la prevalencia de cada alelo y cada genotipo posible (frecuencias de alelo y genotipo) o se definieron bajo haplotipos de riesgo o una combinación de genotipos. Las frecuencias de cada alelo y posible genotipo o haplotipo se calcularon con sus intervalos de confianza (IC) del 95%. Se utilizó el chi cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher para la comparación de variables categóricas. Se utilizó la prueba *t* de Student o la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de variables cuantitativas. La frecuencia de los genotipos para cada polimorfismo se comparó entre los diferentes grupos

## ***Material y métodos***

---

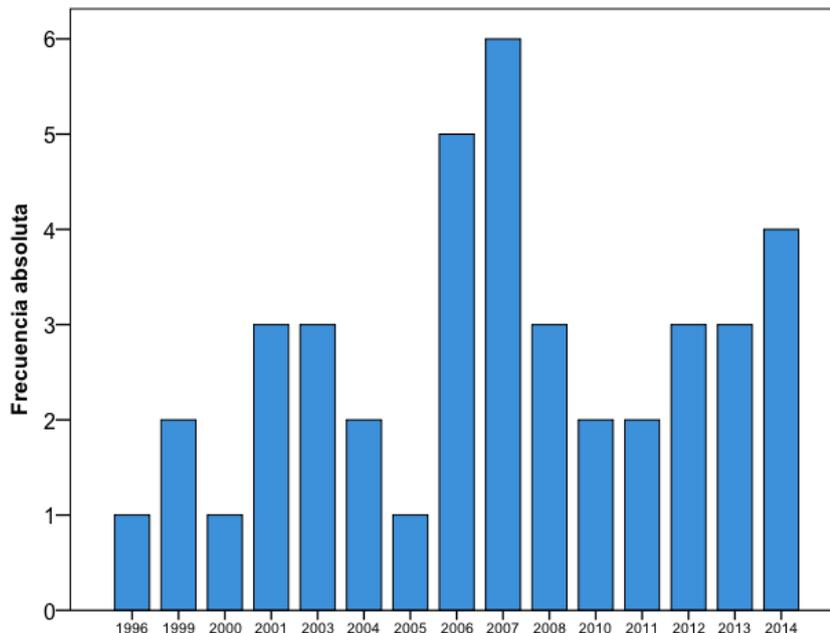
utilizando el equilibrio de Hardy-Weinberg con la prueba de chi cuadrado de Pearson. Los odds ratios (ORs) y sus intervalos de confianza (IC) del 95% se calcularon para estimar la relación de los polimorfismos con la gravedad de la enfermedad en pacientes vs. controles utilizando modelos de regresión logística binaria no condicional. Todas las pruebas fueron bilaterales, y las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS versión 15 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## Resultados

## **4. Resultados**

### **4.1. Análisis estadístico de la serie de niños con enfermedad de Perthes.**

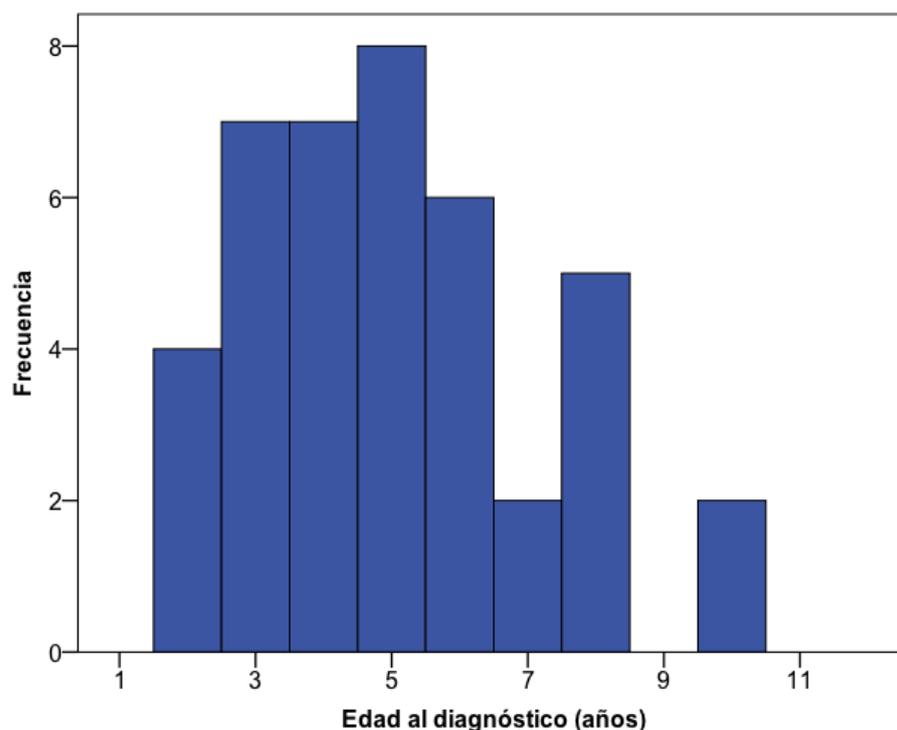
En el periodo 2005 a 2014 se obtuvieron muestras sanguíneas de 41 casos de enfermedad de Perthes diagnosticados en la Unidad de Ortopedia Infantil del Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla” entre enero del 1996 y diciembre de 2014. En el periodo de reclutamiento, el ritmo medio de inclusión de pacientes con enfermedad de Perthes fue de 4,5 casos /año (figura 4.1).



*Figura 4.1. Diagrama de barras que muestra el año de diagnóstico de la enfermedad y número de casos.*

De total de casos, el 87,7% (36 casos) eran varones y 12,2% (5 casos) mujeres. Cuando se detectó la enfermedad los pacientes tenían una edad media de 5,42 años (DE 2,17) con rango mínimo de 2,04 años y rango máximo 10,85 años (figura 4.2). El seguimiento medio fue de 75,5 meses (DE 45,3).

Ningún paciente presentó historia personal de eventos trombóticos previos, ni se encontró evidencia de enfermedad trombótica en sus familiares.



*Figura 4.2. Histograma que muestra la distribución de la edad al diagnóstico de la enfermedad de Perthes en los pacientes incluidos en la serie.*

En el curso de la evolución de la enfermedad se afectaron ambas caderas en 10 enfermos (24,4%), de ellos el 90% eran varones (9 varones y 1 mujer).

En cuanto a la gravedad de la afectación epifisaria no había ningún caso en el grado I de Catterall, mientras que en el grado II había 5 casos (12,2%), en el grado III 18 (43,9%) y en el grado IV 18 casos (43,9%). Ello supone que 36 casos (87,8%) se encontraban en una fase grave de la enfermedad (grado III y IV de Catterall) (figura 4.3). En la primera fase del estudio, en los enfermos en los que la afectación era bilateral se incluyó solo la cadera que presentaba la afectación más grave.

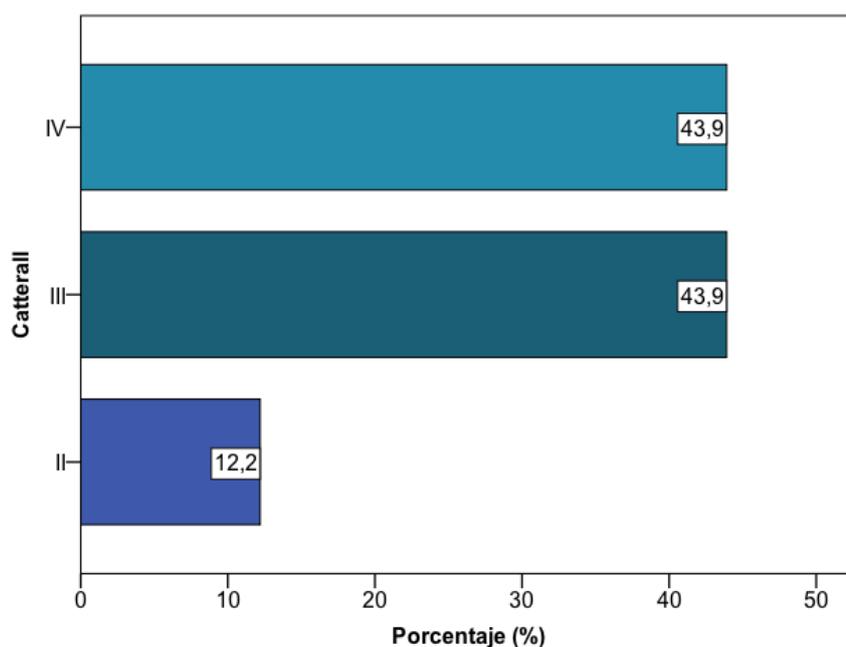


Figura 4.3. Distribución de los casos según gravedad en el momento del diagnóstico valorada siguiendo la clasificación de Catterall.

El 100% de las niñas tenían un Catterall III/IV mientras que el 83,3% de los niños (30 casos) estaban en esa categoría, ( $X^2$  0,976; df:1; p:0,433) (tabla 4.2).

En una segunda fase del estudio, en los casos de afectación bilateral se incluyeron ambas caderas. De este modo, en el momento del diagnóstico, 3 caderas (6%) eran de grado I en la escala de Catterall, 7 caderas eran de grado II (14%), 21 caderas eran de grado III (41%) y 20 caderas eran de grado IV (39%). Esto implica que, en el momento del diagnóstico, 41 caderas (80%) se encontraban en una fase grave de la enfermedad (Catterall grados III y IV).

Respecto a la actitud adoptada, se decidió intervención quirúrgica en 25 pacientes (61% de la serie) mientras que el resto se decidió observación.

Al final del seguimiento, al aplicar la clasificación de Stulberg, que añade el concepto de congruencia de la cabeza femoral para relacionar los hallazgos radiológicos con el pronóstico, se objetivó que 27 niños (65,9%) se encontraban en estadio I-II, 5 niños (12,2%) estaban en estadio III y 9 niños (22%) presentaban un estadio IV-V (tabla 4.1).

*Tabla 4.1. Características de los pacientes de la serie.*

	<b>Pacientes Perthes (N: 41)</b>
<b>Sexo (varones)</b>	36 (87,7%)
<b>Edad al diagnóstico</b>	5,42 años (DE 2,17)
<b>Afectación bilateral</b>	10 (24,4%)
<b>Clasificación de Catterall</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• I</li><li>• II</li><li>• III</li><li>• IV</li></ul>	-- 5 (12,2%), 18 (43,9%) 18 (43,9%).
<b>Clasificación de Stulberg</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• I-II</li><li>• III</li><li>• IV-V</li></ul>	27 (65,9%) 5 (12,2%) 9 (22%)
<b>Intervención quirúrgica</b>	25 (61%)
<b>Evolución favorable</b>	27 (65,9%)

*DE: desviación estándar.*

*Tabla 4.2. Relación de la gravedad de la enfermedad con el sexo y la edad.*

	Caterall II (N: 6)	Caterall III-IV (N: 35)	P
<b>Sexo</b>			
<b>Mujer</b>	0	5 (14,3%)	0,433
<b>Varón</b>	6 (100%)	30 (85,7)	
<b>Edad &gt; 6 años</b>	3 (50%)	12 (34,3%)	0,380

#### **4.1.1. Evolución clínica.**

Al final del seguimiento y según valoración de la escala Stulberg, se objetivó que el 65,9% de los pacientes habían presentado una evolución favorable (Stulberg I-II), el 12,2% tuvieron un curso evolutivo regular (Stulberg III) mientras que el 22% (9 casos) presentaron mala evolución (Stulberg IV-V).

##### **4.1.1.1 Evolución clínica según la actitud adoptada.**

Al estudiar la asociación entre la actitud adoptada con relación a la evolución posterior, en nuestra serie, si bien no fue estadísticamente significativa, no se detectó relación entre el hecho de haber efectuado intervención quirúrgica y resultado ulterior, pues el 40% de los pacientes intervenidos quirúrgicamente presentaron evolución desfavorable, frente al 25% de los

que tuvieron actitud conservadora ( $X^2$  0,976; df 1; p: 0,323). El 60% de los enfermos operados evolucionaron de forma favorable (tabla 4.3).

*Tabla 4.3. Características de los pacientes con enfermedad de Perthes según evolución clínica.*

	Evolución favorable (Stulberg I-II) (N: 27)	Evolución no favorable (Stulberg III-V) (N: 14)	P
<b>Cirugía</b>	15 (60%)	10 (40%)	0,323
<b>Edad &gt; 6 años</b>	11 (73,3%)	4 (26,7%)	0,443
<b>Catterall</b>			
<b>I</b>	---	---	
<b>II</b>	4 (80%)	1 (20%)	0,445
<b>III</b>	13 (72,2%)	5 (27,8%)	
<b>IV</b>	10 (55,6%)	8 (44,4%)	
<b>Sexo</b>			
<b>mujer</b>	2 (40%)	3 (60%)	0,317
<b>varón</b>	25 (69,4%)	11 (30,6%)	
<b>Edad diagnóstico</b>	5,3 (DE: 1,9)	5,9 (DE: 2,6)	0,730

*DE: desviación estándar.*

Respecto a la gravedad de la lesión y su vínculo con el resultado, se objetivó que el 36,1% de los casos graves (Caterall III y IV) evolucionaron de forma no favorable, mientras que sólo un caso de los catalogados inicialmente como leves (Caterall I-II) (20 %) presentó una mala evolución ( $X^2$  1,6; df 2;  $p=0,445$ ) (tabla 4.3).

Por otro lado, se analizó la relación entre la edad al diagnóstico y la evolución clínica posterior. En la serie que se presenta no se evidenció asociación entre ambas variables, pues el 26,7% de los pacientes mayores de 6 años y el 38,5% de los menores de 6 años al diagnóstico tuvieron una evolución no favorable ( $X^2$  0,588; df 1;  $p= 0,443$ ) (tabla 4.3 y figura 4.4).

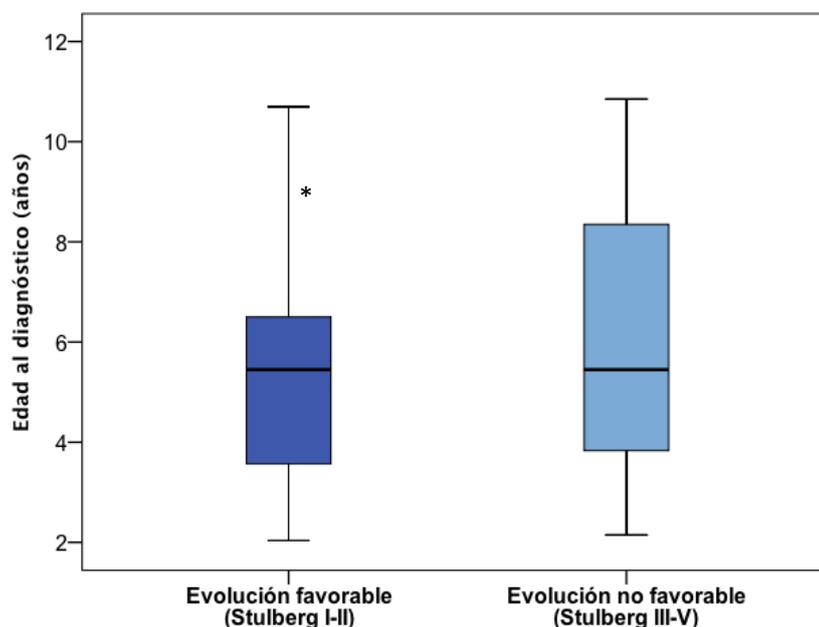


Figura 4.4. Edad al diagnóstico de la enfermedad de Perthes de los casos incluidos en el estudio, según la evolución clínica posterior evaluada siguiendo la clasificación de Stulberg. \*  $p > 0,05$ .

Así mismo se objetivó que los que el 40% de las niñas y el 69,4% de los niños tuvieron una evolución favorable (Stulberg I-II) (tabla 4.3).

**4.1.1.2. Evolución clínica tras la actitud adoptada dependiendo de la edad de diagnóstico.**

En los pacientes menores de 6 años, se adoptó cirugía en 14 de ellos. Se apreció que, para este grupo terapéutico, el 57,1% tuvo una evolución favorable. En el grupo en el que se adoptó actitud conservadora, el 66,7 % de ellos también presentaron resultados positivos ( $p=0,171$ ) (tabla 4.4).

En los niños mayores de 6 años se adoptó cirugía en 11, de los cuales 7 (63,6%) tuvieron una evolución favorable; mientras que en todos los niños mayores de 6 años con tratamiento conservador tuvieron buena evolución ( $p=0,371$ )

*Tabla 4.4. Características de los pacientes según evolución clínica, actitud y edad al diagnóstico.*

	Stulberg IV-V	Stulberg III	Stulberg I-II	p
Menores 6 años	N: 6	N: 4	N: 16	
Conservador	1 (8,3%)	3 (25%)	8 (66,7%)	0,171
Cirugía	5 (38,5%)	1 (7,7%)	8 (57,1%)	
Mayores 6 años	N: 3	N: 1	N: 11	
Conservador	0	0	4 (100%)	0,371
Cirugía	3 (27,3%)	1 (9,1%)	7 (63,6%)	

**4.1.1.3. Evolución clínica tras la actitud adoptada dependiendo de la afectación bilateral.**

En los pacientes con afectación bilateral observamos que en el 100% de los que se adoptó tratamiento conservador, presentaron una evolución intermedia al final del seguimiento, mientras que en los que optó por actitud quirúrgica el 50% presentó buena evolución y otro 50% mala evolución ( $p=0,007$ ) (Tabla 4.4). En este grupo de pacientes, la cirugía respecto a la actitud conservadora incrementa por 5 la probabilidad de buena evolución clínica (Stulberg I-II) (OR 5; IC95%: 0,2 a 136,3).

*Tabla 4.5. Características de los pacientes según evolución clínica, actitud y afectación bilateral.*

	Stulberg IV-V	Stulberg III	Stulberg I-II	p
Bilateral	N: 4	N: 2	N: 4	
Conservador	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0,007
Cirugía	4 (50%)	0	4 (50%)	
Unilateral	N 5	N 3	N 23	
Conservador	1 (7,1%)	1 (7,1%)	12 (85,7%)	0,386
Cirugía	4 (23,5%)	2 (11,8%)	11 (64,7%)	

Por el contrario, en los casos de afectación unilateral, no se detectó asociación entre la actitud terapéutica adoptada y el resultado posterior valorado en la escala de Stulberg (tabla 4.5). No obstante, para los casos unilaterales, el tratamiento conservador multiplica casi por 3 la probabilidad de buena evolución (Stulberg I-II) frente a mala evolución (Stulberg III-V) pero sin alcanzar significación estadística (OR 3,3; IC95%: 0,5 a 19,7).

**4.1.1.4. Evolución clínica tras la actitud adoptada dependiendo del sexo de los pacientes.**

Todas las niñas del estudio fueron intervenidas quirúrgicamente. Del conjunto de los 36 niños, 20 se intervinieron. El 65% de estos niños intervenidos presentaron buena evolución, mientras que el 75% de los niños con actitud conservadora tuvieron también buena evolución ( $p=0,026$ ). (tabla 4.6).

El 65% de los niños operados han evolucionado de forma favorable con un Stulberg I-II, mientras que sólo el 40% de las niñas han tenido una evolución favorable ( $X^2 8,7$ ;  $df 2$ ;  $p= 0,013$ ).

	Stulberg IV-V	Stulberg III	Stulberg I-II	P
Cirugía	N:8	N:2	N:15	
Niñas	1(20%)	2 (40%)	2 (40%)	
Niños	7 (35%)	0 (0%)	13 (65%)	0, 013

*Tabla 4.6. Características de los pacientes según evolución clínica, actitud y sexo.*

	Stulberg IV-V	Stulberg III	Stulberg I-II	P
Niñas	N 1	N 2	N 2	
Conservador	0	0	0	-----
Cirugía	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	
Niños	N 8	N 3	N 25	
Conservador	1 (6,2%)	3 (18,8%)	12 (75%)	0,026
Cirugía	7 (35%)	0 (0%)	13 (65%)	

#### **4.1.1.5. Evolución clínica tras la actitud adoptada dependiendo de la gravedad de la enfermedad de Perthes al diagnóstico.**

En los 35 casos graves de enfermedad de Perthes se adoptó actitud conservadora en el 34,3% (12 casos) de los mismos. De ellos, 9 casos (75%) presentaron buenos resultados.

Por el contrario, en el 56,5% de los casos graves con actitud quirúrgica, se objetivó evolución favorable. Sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística ( $p=0,222$ ) (tabla 4.7).

Tabla 4.7. Características de los pacientes según evolución clínica, actitud y gravedad al diagnóstico.

	Stulberg IV-V	Stulberg III	Stulberg I-II	P
Leves (Catterall I-II)	N	N 1	N 5	
Conservador	0	1 (25%)	3 (75%)	1,000
Cirugía	0	0	2 (100%)	
Graves (Catterall III-IV)	N 9	N 4	N 22	
Conservador	1 (8,3%)	2 (16,7%)	9 (75%)	0,222
Cirugía	8 (34,8%)	2 (8,7%)	13 (56,5%)	

Se objetivó que la cirugía incrementaba el riesgo de evolución no favorable, aunque no de modo significativo (OR 2,1; IC95%: 0,5 a 8,6; p=0,283). Dado que la estrategia de tratamiento influye en el resultado y que se trata de una variable que puede estar influenciada por otras como la gravedad al diagnóstico, se efectuó análisis multivariable incluyendo en el mismo el sexo femenino, edad al diagnóstico superior al 6 años, afectación bilateral y gravedad (clasificación de Catterall) ya que son variables que se han asociado con los resultados evolutivos. Al incluir estas variables en el modelo no se objetivó asociación entre la evolución desfavorable y la cirugía como opción terapéutica (OR 1,4; IC95% 0,3 a 7,7; p=0,679).

**4.2. Distribución de los genotipos y de las frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados del Factor V, protrombina, MTHFR y glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en los pacientes diagnosticados de enfermedad de Perthes.**

**4.2.1. Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo de la afectación unilateral o bilateral.**

En relación con la mutación del Factor V, las frecuencias alélicas fueron similares en ambos grupos de pacientes (afectación unilateral vs bilateral). Igualmente, no se detectaron diferencias en cuanto a la distribución de genotipos en ambos grupos (tabla 4.8).

Para la mutación C677T de la MTHFR, se objetivó una relación positiva con significación estadística entre la presencia de genotipo CT ó TT y la afectación unilateral (OR 8,4: IC95%: 1,5 a 47). Relación que se observó también al estudiar las frecuencias alélicas.

En cuanto al polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa, no se detectaron diferencias significativas en relación con la distribución de genotipos ni a las frecuencias alélicas entre ambos grupos de pacientes.

Respecto a la mutación G20210A de la protrombina, no se estudió pues todos los casos fueron homocigotos para el alelo normal.

#### **4.2.2. Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo del sexo de los pacientes.**

Atendiendo al sexo de los pacientes incluidos en el estudio, se objetivó que para el polimorfismo de la MTHFR, existía una relación positiva entre el sexo varón y los genotipos CT o TT, así como con la presencia del alelo T. No obstante, esta relación no alcanzó significación estadística. En el resto de polimorfismos, la relación entre sexo varón y dichos genotipos y el alelo A (del Factor V Leiden) y el alelo A<sup>2</sup> (de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa), fue negativa pero sin lograr significación estadística (tabla 4.9).

#### **4.2.3 Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo de la edad de debut de la enfermedad de Perthes.**

Respecto a la edad de debut de la enfermedad de Perthes, se objetivó para la mutación C677T de MTHFR y el polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa, una relación positiva entre los genotipos con alelo mutado y la edad superior a seis años, si bien esta asociación no fue estadística significativa.

Con relación a la mutación del factor V, la relación entre edad superior a seis años y genotipos con alelo mutado fue negativa pero igualmente sin lograr significación estadística (tabla 4.10)

*Tabla 4.8. Genotipo y distribución alélica de los diferentes polimorfismos en relación con la afectación bilateral o unilateral de los niños con enfermedad de Perthes de nuestra serie.*

	<b>Genotipo</b>	<b>Unilateral</b>	<b>Bilateral</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>P</b>
<b>Factor V</b>	GG	31 (100%)	9 (90%)	1	0,244
	GA	0	1 (10%)	9,9 (0,4 a 264,8)	
	AA	0	0		
Frecuencia alélica	G	100%	90%		0,548
	A		10%	9,9 (0,4 a 264,8)	
<b>MTHFR</b>	CC	10 (32,3%)	8 (80%)	1	0,02
	CT	18 (58,1%)	2 (20%)	8,4 (1,5 a 47)	
	TT	3 (9,7%)	0		
Frecuencia alélica	C	61,3%	85%		0,03
	T	38,7%	15%	5,7 (1,2 a 26,7)	
<b>GP IIb/IIIa</b>	A1A1	22 (71%)	6 (60%)	1	0,698
	A1A2	8 (25,8%)	4 (40%)	1,6 (0,4 a 7,2)	
	A2A2	1 (3,3%)	0		
Frecuencia alélica	A1	85%	80%		0,816
	A2	14,5%	20%	1,5 (0,4 a 5,4)	
<b>Protrombina</b>	100%	100%	-----	100%	
	(0%)	(0%)		(0%)	
	(0%)	(0%)		(0%)	
Frecuencia alélica	100%	100%	-----	100%	
	0%	0%		0%	

*Tabla 4.9. Genotipo y distribución alélica de los diferentes polimorfismos dependiendo del sexo de los enfermos de Perthes.*

	<b>Genotipo</b>	<b>Mujer</b>	<b>Varón</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>P</b>
<b>Factor V</b>	GG	5 (100%)	35 (97,2%)	1	1,000
	GA	0	1 (2,8%)		
	AA	0	0	0,5 (0,1 a 12,9)	
Frecuencia alélica	G	100%	98,6%		1,000
	A	0	1,4%	0,5 (0,1 a 12,9)	
<b>MTHFR</b>	CC	3 (60%)	15 (41,7%)	1	0,638
	CT	1 (20%)	18 (50%)	2,1 (0,3 a 14,2)	
	TT	1 (20%)	3 (8,3%)		
Frecuencia alélica	C	70%	66,7%		1,000
	T	30%	33,3%	1,2 (0,3 a 4,9)	
<b>GP IIb/IIIa</b>	A1A1	3 (60%)	25 (69,4%)	1	0,645
	A1A2	3 (40%)	10 (27,8%)	0,6 (0,1 a 4,5)	
	A2A2	0 (3,3%)	1 (2,8%)		
Frecuencia alélica	A1	80%	83,3%		0,792
	A2	20%	16,7%	0,8 (0,1 a 4,2)	
<b>Protrombina</b>	GG	100%	100%	-----	
	GA	(0%)	(0%)		
	AA	(0%)	(0%)		
Frecuencia alélica	G	100%	100%	-----	
	A	0%	0%		

*Tabla 4.10. Genotipo y distribución alélica de los diferentes polimorfismos en relación con edad de debut de la enfermedad de Perthes.*

	<b>Genotipo</b>	<b>&lt;6 años</b>	<b>&gt; 6 años</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>P</b>
<b>Factor V</b>	GG	25 (96,3%)	15 (100%)	1	1,000
	GA	1 (3,7%)	0	0,5 (0,02 a 14,3)	
	AA	0	0		
Frecuencia alélica	G	98,1%	100%		1,000
	A	1,9%	0%	0,5 (0,02 a 14,3)	
<b>MTHFR</b>	CC	12 (46,2%)	6 (40%)	1	0,702
	CT	10 (38,5%)	9 (60%)	1,2 (0,4 a 4,7)	
	TT	4 (15,3%)	0 (20%)		
Frecuencia alélica	C	66,7%	70%		0,668
	T	33,3%	30%	1,2 (0,5 a 3,3)	
<b>GP IIb/IIIa</b>	A1A1	19 (38,4%)	9 (60%)	1	0,492
	A1A2	6 (23,1%)	6 (40%)	1,8 (0,5 a 6,9)	
	A2A2	1 (3,8%)	0 (2,8%)		
Frecuencia alélica	A1	83,3%	80%		0,592
	A2	16,7%	20%	1,3 (0,4 a 4,4)	
<b>Protrombina</b>	GG	100%	100%	-----	
	GA	(0%)	(0%)		
	AA	(0%)	(0%)		
Frecuencia alélica	G	100%	100%	-----	
	A	0%	0%		

#### **4.2.4 Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo de la actitud terapéutica adoptada.**

No se detectó asociación significativa entre los genotipos y frecuencias alélicas de los diferentes polimorfismos y la actitud adoptada (tabla 4.11). Destaca que salvo en el caso del polimorfismo del factor V, donde la relación entre ambas variables fue en sentido positivo, para el resto de los polimorfismos fue negativo pero tal como se ha comentado, sin significación estadística.

#### **4.2.5 Distribución de genotipos y frecuencias alélicas dependiendo de la gravedad al diagnóstico de la enfermedad de Perthes, evaluada según la clasificación de Catterall.**

Respecto a la mutación del factor V (Factor V Leiden), se detectó una relación negativa entre los genotipos con alelo mutado y los casos graves de enfermedad, pero sin que esta asociación fuera estadísticamente significativa (OR 0,5; IC95: 0,01 a 13,3).

En el mismo sentido fueron los resultados objetivados cuando se analizaron las frecuencias alélicas y la gravedad de la enfermedad, pues la presencia de alelo mutado A presentó una OR para los casos graves de 0,5 (IC95%: 0,02 a 14) (tabla 5.12).

*Tabla 4.11. Genotipo y distribución alélica de los diferentes polimorfismos en relación con la estrategia terapéutica.*

	<b>Genotipo</b>	<b>Conservador</b>	<b>Cirugía</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>P</b>
<b>Factor V</b>	GG	25 (100%)	15 (93,8%)	1	1,000
	GA	0 (0%)	1 (6,2%)	4,7 (0,2 a 123)	
	AA	0	0		
Frecuencia alélica	G	100%	96,8%		0,820
	A	0	3,2%	4,8 (0,2 a 121)	
<b>MTHFR</b>	CC	5 (31,3%)	13 (52%)	1	0,196
	CT	9 (56,3%)	10 (40%)	0,4 (0,1 a 1,4)	
	TT	2 (12,5%)	2 (8%)		
Frecuencia alélica	C	59,4%	72%		0,344
	T	40,6%	28%	0,6 (0,2 a 1,5)	
<b>GP IIb/IIIa</b>	A1A1	10 (62,5%)	18 (72%)	1	0,525
	A1A2	5 (31,1%)	7 (28%)	0,6 (0,2 a 2,5)	
	A2A2	1 (6,2%)	0 (0%)		
Frecuencia alélica	A1	78,1%	86%		0,532
	A2	21,9%	14%	0,6 (0,2 a 1,9)	
<b>Protrombina</b>	GG	100%	100%	-----	
	GA	(0%)	(0%)		
	AA	(0%)	(0%)		
Frecuencia alélica	G	100%	100%	-----	
	A	0%	0%		

*Tabla 4.12. Genotipo y distribución alélica de los diferentes polimorfismos en relación con la gravedad al diagnóstico.*

	<b>Genotipo</b>	<b>Catterall I-II</b>	<b>Catterall III-IV</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>P</b>
<b>Factor V</b>	GG	6 (100%)	34 (97,1%)	1	1,000
	GA	0 (0%)	1 (2,9%)	0,5 (0,01 a 13,3)	
	AA	0 (0%)	0 (0%)		
Frecuencia alélica	G	100%	98,6%		0,676
	A	0 (0%)	1,4%	0,5 (0,02 a 14)	
<b>MTHFR</b>	CC	2 (33,3%)	16 (45,7%)	1	0,575
	CT	4 (66,7%)	15 (42,9%)	0,6 (0,1 a 3,7)	
	TT	0 (0%)	4 (11,4%)		
Frecuencia alélica	C	66,6%	67,1%		0,100
	T	33,3%	32,9%	0,9 (0,3 a 3,6)	
<b>GP IIb/IIIa</b>	A1A1	2(33,3%)	26 (74,3%)	1	0,05
	A1A2	4 (66,7%)	8(22,8%)	0,17 (0,03 a 1,11)	
	A2A2	0 (0%)	1 (2,9%)		
Frecuencia alélica	A1	66,7%	85,4%		0,010
	A2	33,3%	14,6%	0,33 (0,08 a 1,30)	
<b>Protrombina</b>	GG	100%	100%	-----	
	GA	(0%)	(0%)		
	AA	(0%)	(0%)		
Frecuencia alélica	G	100%	100%	-----	
	A	0%	0%		

### **4.3 Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de los polimorfismos del Factor V, protrombina, MTHFR y glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en los pacientes con enfermedad de Perthes versus controles (adolescentes del proyecto AVENA de Santander).**

Se incluyeron como controles 118 pacientes pertenecientes al proyecto AVENA de Santander. De ellos, 62 (52,5%) eran mujeres. La edad media de los controles fue de 15,7 años (DE 1,7).

La distribución de genotipos para los diferentes polimorfismos analizados tanto en la población de controles como en la población de casos cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg (tabla 4.13).

#### **4.3.1 Mutación del Factor V (Factor V Leiden).**

La mayoría de los casos y también de los controles presentaban genotipo normal para la mutación G1691A del Factor V (Factor V Leiden). No hubo ningún caso de genotipo homocigoto AA. Se detectó, aunque no de modo significativo, una tendencia positiva entre los casos de enfermedad y la presencia de alelos mutados para el polimorfismo analizado del Factor V (OR 2,9 (IC95% 0,2 a 47,8)).

La prevalencia de alelos mutados fue de 1,2% (IC95% 23,7 a 43,7%) en los casos y 0,4% (IC95% 0,1 a 2,4) en los controles. La OR de A frente G fue de

2,9 (IC95% 0,18 a 47,9) lo que sugiere que el riesgo de tener Perthes fue 2,9 veces más elevada con el alelo A que con el alelo G. Se objetivó que ser heterocigoto respecto a normal para el Factor V, incrementaba el riesgo de Perthes un 2,93 veces (OR 2,93; IC95% 0,18 a 47,9).

### **4.3.2 Mutación C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)**

Para el genotipo del polimorfismo C677T de la MTHFR no se detectaron diferencias significativas entre los casos de enfermedad de Perthes y los controles del estudio Avena. La prevalencia de alelos mutados fue de 32,9% (IC95% 23,7 a 43,6) en el grupo de los casos y 36% (IC95% 30,2 a 42,3) en los controles. La OR de T frente C fue de 0,87 (IC95% 0,51 a 1,40) lo que sugiere que el riesgo de tener Perthes fue 0,87 veces más elevada con el alelo T que con el alelo C. El hecho de ser homocigoto para el alelo T (mutado) o heterocigoto respecto a ser homocigoto para el alelo C (normal), incrementaba el riesgo de Perthes 0,864 (OR 0,8; IC95%: 0,4 a 1,7).

### **4.3.3 Polimorfismo PI A<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.**

El polimorfismo de la PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa presentó una distribución similar tanto en los casos como en los controles del estudio AVENA, si bien, aunque sin significación estadística, se objetivó que existía un mayor riesgo de enfermedad de Perthes en aquellos que eran homocigotos para el alelo mutado o heterocigotos respecto a sujetos con genotipo normal (OR 1,3; IC95%: 0,6 a 2,8). En la misma línea, la

prevalencia de alelos mutados fue de 17,1% (IC95% 10,5 a 26,6) los casos y 14,4% (IC95% 10,5 a 19,5) en los controles. La OR del alelo A2 frente al alelo A1 fue de 1,22 (IC95% 0,6 a 2,4) lo que sugiere que el riesgo de tener Perthes fue 1,2 veces más elevada con el alelo A2 que con el alelo A1, aunque de forma no estadísticamente significativa  $p=0,561$ .

### **4.3.4 Mutación G20210A de la protrombina**

Todos los enfermos de Perthes y la mayoría de los controles fueron homocigotos GG para la mutación G20210A de la protrombina. Tan solo 4 casos de los controles y ninguno de los casos fueron heterocigotos GA para ese polimorfismo. No se detectaron casos homocigotos AA. La prevalencia de alelos mutados A fue de 1,7% (IC95% 0,6 a 4,3) en los controles y ninguno en los casos. La OR del alelo A respecto al alelo G resultó de 0,3 (IC95% 0,01 a 5,7), lo que sugiere el riesgo de tener Perthes fue 0,3 veces más elevada con el alelo A que con el alelo G.

## Resultados

Tabla 4.13. Asociación de cada polimorfismo con la enfermedad de Perthes.

	Genotipo	Controles	Perthes	OR (IC95%)	P
<b>Factor V</b>	GG	117 (99,2%)	40 (97,2%)	1	0,431
	GA	1 (0,8%)	1 (2,8%)	2,9 (0,2 a 47,8)	
	AA	0	0		
Frecuencia alélica	G	99,6%	98,8%		0,430
	A	0,4%	1,2%	2,9 (0,2 a 46,9)	
<b>MTHFR</b>	CC	47 (39,8%)	18 (43,9%)	1	0,648
	CT	57 (48,3%)	19 (46,3%)	0,8 (0,4 a 1,7)	
	TT	14 (11,9%)	4 (9,8%)		
Frecuencia alélica	C	64%	67,1%		0,711
	T	36%	32,9%	0,9 (0,4 a 1,4)	
<b>GP IIb/IIIa</b>	A1A1	87 (73,7%)	28 (68,3%)	1	0,503
	A1A2	28(23,7%)	12 (29,3%)	1,3 (0,6 a 2,8)	
	A2A2	3 (2,5%)	1 (2,4%)		
Frecuencia alélica	A1	85,6%	82,9%		0,561
	A2	14,4%	17,1%	1,2 (0,6 a 2,4)	
<b>Protrombina</b>	GG	114 (96,6%)	41 (100%)	1	
	GA	4 (3,4%)	0 (0%)	0,3 (0,01 a 5,7)	0,226
	AA	0 (0%)	0 (0%)		
Frecuencia alélica	G	98,3%	100%		
	A	1,7%	0	0,3 (0,01 a 5,7)	0,226

**4.4. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de los polimorfismos del Factor V, protrombina, MTHFR y glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en las caderas con enfermedad de Perthes versus controles (adolescentes del proyecto AVENA de Santander).**

**4.4.1 Polimorfismo PI A<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa.**

Se observaron distribuciones similares tanto en los casos de enfermedad de Perthes como en los controles para los alelos y genotipos; por lo tanto, no se puede atribuir ningún riesgo significativo para enfermedad de Perthes a la presencia de este polimorfismo. La prevalencia de alelos mutados fue del 17,1% (intervalos de confianza del 95%: 10,5 a 26,6) en pacientes con enfermedad y del 14,4% (intervalos de confianza del 95%, 10,5 a 19,5) en los controles. El odds ratio del alelo A2 versus el alelo A1 fue de 1,22 (intervalos de confianza del 95%: 0,6 a 2,4;  $p = 0,561$ ). El odds ratio para la enfermedad de Perthes en aquellos que eran homocigotos o heterocigotos para el alelo mutado en relación con los sujetos con un genotipo normal fue de 1,3 (intervalos de confianza del 95%: 0,6 a 2,8) (tabla 4.14).

**4.4.2 Mutación C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)**

No se detectaron diferencias significativas en las frecuencias de los alelos entre los casos de LCPD y los controles. La prevalencia de alelos mutados

fue del 32,9% (intervalos de confianza del 95%: 23,7 a 43,6) en el grupo de caderas con enfermedad de Perthes y del 36% (intervalos de confianza del 95%: 30,2 a 42,3) en los controles, siendo el odds ratio de T versus C de 0,9 (intervalos de confianza del 95%: 0,4 a 1,4) (tabla 4.14).

### **4.4.3 Mutación del Factor V (Factor V Leiden)**

La mayoría de los casos (97%) y controles (99%) tenían un genotipo normal para la mutación G1691A en el gen F5. No se identificaron casos de haplotipos homocigotos mutados, ni en casos ni en controles. Sin embargo, se observó una tendencia positiva entre la enfermedad de Perthes y la presencia de mutación del factor V Leiden, siendo el odds ratio de A versus G de 2,9 (intervalos de confianza del 95% de 0,2 a 46,9) (tabla 4.14).

### **4.4.4 Mutación G20210A de la protrombina**

Mutación G20210A del gen de la protrombina F2 (rs1799963(A)). Todos los pacientes con LCPD y la mayoría de los controles (97%) eran homocigotos G/G para la mutación G20210A del gen de la protrombina F2, y solo cuatro de los controles eran heterocigotos (G/A) para el polimorfismo. No se detectaron casos homocigotos de AA. La prevalencia de alelos A mutados fue del 1,7% (intervalos de confianza del 95%: 0,6 a 4,3) en los controles, mientras que no se detectaron alelos A mutados en los casos, con un odds ratio de 0,3 (intervalos de confianza del 95%: 0,01 a 5,7) para el alelo A con respecto al alelo G (tabla 4.14).

## Resultados

*Tabla 4.14. Genotipo y distribución de frecuencias alélicas entre caderas con enfermedad de Perthes y controles.*

	<b>Genotipo</b>	<b>Controles</b>	<b>Perthes</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>P</b>
<b>Factor V</b>	GG	117 (99,2%)	49 (96,1%)	1	0,206
	GA	1 (0,8%)	2 (3,9%)	4,8 (0,4 a 53,9)	
	AA	0	0		
Frecuencia alélica	G	235 (99%)	100 (98%)		0,452
	A	1 (1%)	2 (2%)	4,7 (0,4 a 52,4)	
<b>MTHFR</b>	CC	47 (39,8%)	26 (51%)	1	0,181
	CT	57 (48,3%)	20 (39,2%)	0,6 (0,3 a 1,2)	
	TT	14 (11,9%)	5 (9,8%)		
Frecuencia alélica	C	151 (63,9%)	72 (70,6%)		0,290
	T	85 (36,1%)	30 (29,4%)	0,7 (0,4 a 1,2)	
<b>GP IIb/IIIa</b>	A1A1	87 (73,7%)	34 (66,7%)	1	
	A1A2	28 (23,7%)	16 (31,4%)	1,4 (0,7 a 2,9)	0,351
	A2A2	3 (2,5%)	1 (1,9%)		
Frecuencia alélica	A1	202 (85,6%)	84 (82,4%)		
	A2	34 (14,4%)	18 (17,6%)	1,4 (0,7 a 2,4)	0,552
<b>Protrombina</b>	GG	114 (96,6%)	51 (100%)	1	
	GA	4 (3,4%)	0 (0%)	0,000	0,999
	AA	0 (0%)	0 (0%)		
Frecuencia alélica	G	232 (98,3%)	102 (100%)		
	A	4 (1,7%)	0	0,3 (0,01 a 4,7)	0,438

**4.5. Distribución de los haplotipos de la mutación C677T de la MTHFR y del polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa en los pacientes diagnosticados de enfermedad de Perthes.**

Se definieron diferentes categorías de riesgo genético-haplotipos mediante la combinación de pares de genotipos. Los haplotipos relacionados con la trombofilia pero que también afectan a la remodelación de la matriz extracelular se indicaron mediante la combinación de los genotipos GP IIb/III y *MTHFR*, mientras que los haplotipos relacionados solo con un estado protrombótico se definieron mediante la combinación de genotipos para el factor V Leiden y la protrombina.

Se consideraron trombofilia de alto riesgo y posible remodelación adversa de la matriz extracelular en haplotipos homocigotos para la variante PIA2 de GP IIb/III (PIA2/PIA2) u homocigotos para el alelo T en *MTHFR* C677T (TT).

Los haplotipos de bajo riesgo se asociaron con la ausencia de la variante PIA2 (PIA1/PIA1) combinada con haplotipos homocigotos no mutados o con heterocigotos para C677T (C/C y C/T).

Los fenotipos de riesgo intermedio se identificaron por la presencia de un alelo (heterocigoto) para PIA2 combinado con haplotipos heterocigotos o no mutados para C667 (C/T y C/C).

Los únicos haplotipos genéticos asociados con un riesgo sustancial de

trombosis se definieron de la siguiente manera: haplotipos con mutación homocigota tanto para el factor V Leiden como para la protrombina G20210 (alto riesgo); haplotipos con mutación homocigota para el factor V Leiden más heterocigotos (G/A) para la protrombina G20210A (riesgo intermedio); haplotipos con AA homocigoto no mutado para G20210A más heterocigotos para el factor V Leiden (bajo riesgo). (Lim M.Y y cols., 2016)

Las frecuencias de los diferentes haplotipos (haplotipos de riesgo bajo, intermedio y alto) y el número de caderas afectadas por enfermedad de Perthes se muestran en la tabla 4.15

En total, el 12% de las caderas ( $n = 6$ ) correspondieron a pacientes con trombofilia de alto riesgo más posible remodelación adversa de la matriz extracelular; el 27% de las caderas ( $n = 14$ ) correspondieron a pacientes con riesgo intermedio, y el 61% ( $n = 31$ ) correspondió a pacientes con bajo riesgo.

Al comparar caderas con enfermedad de Perthes y controles, no se encontró una asociación significativa entre los haplotipos genéticos definidos y el riesgo de padecer la enfermedad (OR: 1,2; intervalos de confianza del 95%: 0,7 a 1,7).

## Resultados

Tabla 4.15. Distribución de los diferentes haplotipos en el total de caderas con enfermedad de Perthes

Número de caderas evaluadas: 51					
Bajo riesgo * N: 31		Riesgo Intermedio * N: 14		Alto riesgo * N: 6	
A1A1 - CC	15 (48.4%)	A1A2 - CT	3 (21.4%)	A2A2 - TT	0
A1A1 - CT	16 (51.6%)	A1A2 - CC	11 (78.6%)	A1A2 - TT	2 (33.3%)
				A1A1- TT	3 (50%)
				A2A2 - CT	1 (16.7%)
				A2A2 - CC	0

\* Haplotipos de bajo riesgo: una combinación del estado homocigoto normal para el polimorfismo PIA2 (A1A1) con el estado homocigoto normal (CC) y heterocigoto (CT) para la mutación C677T del gen *MTHFR*. Haplotipos de riesgo intermedio: aquellos heterocigotos para el polimorfismo PIA2 (A1A2) más haplotipos homocigotos normales (CC) o heterocigotos (CT) para la mutación C677T del gen *MTHFR*. Haplotipos de alto riesgo: una combinación del estado homocigoto para los genes *MTHFR* (TT) o *PIA2* (A2A2).

Sin embargo, cuando se consideró la gravedad en el momento del diagnóstico para cada haplotipo, encontramos que el 67% de los haplotipos de alto riesgo definidos para trombofilia y posible remodelación adversa de la matriz extracelular se clasificaron como estadio Catterall IV, mientras que solo el 29% de los haplotipos intermedios se clasificaron como Catterall IV ( $p = 0,05$ ) (tabla 4.16). Ninguno de los pacientes con enfermedad de Perthes o los controles se clasificaron como haplotipos genéticos con un riesgo sustancial de trombosis (homocigoto para el factor V Leiden u homocigoto para la protrombina G20210A).

*Tabla 4.16 Distribuciones de haplotipos y la gravedad de las caderas con enfermedad de Perthes basadas en la clasificación de Catterall*

	Haplotipos			p
	*Bajo riesgo	*Riesgo intermedio	*Alto riesgo	
<b>Caterall I</b>	<b>1 (3,2%)</b>	<b>1 (7,1%)</b>	<b>1 (16,7%)</b>	<b>0,05</b>
<b>Caterall II</b>	<b>2 (6,5%)</b>	<b>5 (35,7%)</b>	<b>0</b>	
<b>Caterall III</b>	<b>16 (51,6%)</b>	<b>4 (28,6%)</b>	<b>1 (16,7%)</b>	
<b>Caterall IV</b>	<b>12 (38,7%)</b>	<b>4 (28,6%)</b>	<b>4 (66,6%)</b>	

\* Haplotipos de bajo riesgo: una combinación del estado homocigoto normal para el polimorfismo PIA2 (A1A1) con el estado homocigoto (CC) y heterocigoto (CT) normal para la mutación C677T de *MTHFR*. Haplotipos de riesgo intermedio: heterocigotos para el polimorfismo PIA2 (A1A2) más homocigotos normales (CC) o heterocigotos (CT) para la mutación C677T del gen *MTHFR*. Haplotipos de alto riesgo: una combinación de *MTHFR* homocigoto (TT) o PIA2 (A2A2).

Como estudio observacional sin intervención, las decisiones quirúrgicas no fueron influenciadas por la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados, sino por la edad, la clasificación de Catterall y la progresión. Por lo tanto, nuestro diseño de estudio no nos permitió realizar un análisis multivariante para definir el papel de los polimorfismos en el resultado según la clasificación de Stulberg. Sin embargo, después de un seguimiento de seis años, el 20% de los pacientes (10 de 51 caderas) tuvieron un resultado no favorable con Stulberg grados IV-V, incluso después de la cirugía. De

acuerdo con nuestros resultados, la presencia de los haplotipos de alto riesgo (homocigotos para *MTHFR*) debe considerarse en el diagnóstico de la gravedad de la enfermedad de Perthes, ya que hasta el 50% (dos de cada cuatro) de los pacientes tuvieron resultados de Stulberg IV-V (tres de cada cuatro en niños menores de 6 años).

## Discusión

## **5. Discusión**

En nuestro estudio hemos revisado 41 niños diagnosticados de enfermedad de Perthes en la Unidad de Ortopedia Infantil del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre los años 1996 y 2014. Dicha unidad es de referencia para toda la provincia de Cantabria así que todos los niños incluidos son los diagnosticados de enfermedad de Perthes en Cantabria durante ese periodo de tiempo y han sido revisados siempre por los miembros de dicha unidad.

Como hemos comentado en la Justificación del estudio, la comunidad autónoma de Cantabria cuenta ventajas determinantes para realizar este tipo de estudios dado que toda la patología pediátrica se concentra en una única unidad hospitalaria y es una región representativa del conjunto del Estado.

Analizamos, en primer lugar, las características demográficas de los niños con enfermedad de Perthes de nuestro estudio y como se distribuían los genotipos y las frecuencias alélicas de las mutaciones G1691A para el factor V (Factor V Leiden), G20210A para el gen de la protrombina, C677T para la MTHFR y el polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa, en dichos niños para ver si estaban relacionados con el curso clínico de la enfermedad, particularmente en las formas más severas.

La enfermedad de Perthes, como se ha comentado previamente, es una patología de la cadera en los niños que consiste en una necrosis avascular de la epífisis proximal del fémur. El suministro de sangre a la epífisis femoral es parcial y temporalmente interrumpido causando una deformidad de la cabeza femoral que, a la larga, según su gravedad, va a conducir al desarrollo de una artrosis de cadera precoz en el adulto. La causa de la pérdida de vascularización permanece desconocida, esto nos ha llevado a investigar posibles alteraciones genéticas en la cascada de coagulación que den luz a su patogenia.

Se han propuesto varias etiologías, pero ninguna ha demostrado la causa de la enfermedad. Las teorías más ampliamente aceptadas se relacionan con la interrupción vascular repetida del aporte sanguíneo a la cabeza femoral, dando lugar a una oclusión venosa con la secundaria hipertensión venosa y muerte ósea. Liu y cols. (Liu y cols., 1991) mostraron en perros que si se obstruía el drenaje venoso del cuello femoral se producía una osteonecrosis que asemejaba a la producida en la enfermedad de Perthes.

Debido al patrón de isquemia, los defectos de la coagulación se han postulado a la hora de ser factores que ponen en peligro el suministro de sangre a la epífisis femoral. Existen variantes polimórficas bien conocidas de los genes que controlan estos factores, que condicionan una tendencia trombofílica o protrombótica y que pueden conducir por tanto a la oclusión vascular de la epífisis femoral. Estos factores serían candidatos para

participar en la patogenia de la enfermedad de Perthes. También hay evidencia de que la remodelación de la matriz extracelular puede ser importante en los procesos relacionados con la mineralización y la necrosis de la cabeza femoral, y algunos factores trombofílicos involucrados en el daño tisular después de los procesos isquémicos también pueden estar implícitos en los mecanismos de remodelación de la matriz extracelular, por lo tanto, relacionados con la gravedad de la enfermedad de Perthes.

Hasta la fecha, los polimorfismos genéticos que se han investigado en relación con Perthes incluyen la resistencia a la proteína C activada (mutación Leiden), la mutación G20210A de la protrombina, la mutación C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa (Kenet G y cols., 2008). Estos factores han sido demostrados como factores de riesgo para la enfermedad de Perthes en algunos estudios (Eldridge J y cols., 2001; Balasa VV y cols., 2004 Vosmaer A y cols., 2010) pero no en otros (Arruda VR y cols., 1999; Hayek S y cols., 1999; Kenet G y cols., 2008).

A diferencia de otros factores de hipercoagulabilidad, el factor V Leiden, la mutación G20210A de la protrombina y la mutación C677T de la MTHFR no están influidos por la edad, la vacunación o infección, siendo los factores genéticos esencialmente asignados al azar en la concepción (también conocido como la aleatorización mendeliana). (Kenet G y cols., 2008.)

Junker (Junker y cols., 1999) encontró que las mutaciones protrombóticas son importantes factores de riesgo para la trombosis venosa durante la

infancia y la adolescencia. Nowak (Nowak y cols., 1996) informó de que en el 52% de la trombosis venosa profunda y el 38% de trombosis arterial en niños, la resistencia a la proteína C está implicada. Schobbes (Schobbes y cols., 1999) objetivó que el factor V Leiden es el factor de riesgo protrombótico más comúnmente encontrado responsable de la trombosis espontánea durante la lactancia y la primera infancia, y que la protrombina G20210A es más importante durante la pubertad y la adolescencia.

Por tanto, todos los polimorfismos que estudiamos representan un importante factor de riesgo genético para el desarrollo de la enfermedad tromboembólica, de tal forma que, si la causa de la enfermedad de Perthes estuviese ligada a un evento tromboembólico, estas mutaciones deberían estar presentes con mayor frecuencia en la población con enfermedad de Perthes que en la población general.

Por otro lado, no tenemos constancia de que hasta el momento se haya estudiado la relación entre el polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa y la enfermedad de Perthes. Este polimorfismo se ha asociado con alto riesgo de trombosis coronaria en edades menores de 60 años (Weiss EJ y cols., 1996) y a diferente respuesta endotelial, tras diferentes daños isquémicos. La glicoproteína plaquetaria GP IIb/IIIa se identifica únicamente en la membrana de las plaquetas activadas. Esta glicoproteína de membrana interacciona con la matriz extracelular y juega un papel crítico en la formación del trombo, ya que se une directamente con el

fibrinógeno. Asimismo, esta molécula es una integrina que juega un papel determinante en la cascada de señalización celular tras su interacción con la matriz extracelular. Por tanto, participa en los mecanismos de activación plaquetaria y de liberación de sustancias al espacio extracelular determinantes de los mecanismos de daño y reparación tisular. La variante PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína se une de forma irreversible con el fibrinógeno en la formación del trombo, mecanismo que puede condicionar una mayor isquemia en ciertos territorios vasculares.

En estudios realizados en otros grupos de pacientes hemos identificado una mayor prevalencia de este polimorfismo en pacientes con mayor daño tisular tras mecanismos de isquemia, mayor incidencia de reestenosis vascular tras colocación de *stents* coronarios (Lefkovits J y cols., 1995; García Ribes M y cols., 1998) o peor evolución de la trombosis venosa retiniana (Cañal J, 2002).

En relación con el polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa y tratándose de la primera vez que se relaciona este polimorfismo con la enfermedad de Perthes, no podemos realizar consideraciones basadas en estudios fisiopatológicos ni descartar, que esta asociación sea casual debido a una selección genética de la muestra estudiada.

La edad de diagnóstico de la enfermedad de Perthes frecuentemente es precoz, a lo largo de la primera década de la vida, y así en nuestra serie la media de edad cuando fueron diagnosticados fue 5,42 años (DE 2,17), edad

similar a la que se describe en la literatura (Joseph B y cols., 1988; Wiig O 2006).

Es, sin embargo, la edad que tiene el niño al inicio de la enfermedad lo que nos importa porque, como vimos en la introducción, es uno de los factores que nos indica la buena o mala evolución de la enfermedad. La edad crítica se sitúa en los 6 años (Rosenfeld SB y cols., 2007; Canavese F y cols., 2008).

Analizando la posible relación entre los polimorfismos estudiados y la edad al diagnóstico, en nuestro estudio observamos que para la mutación C677T de la MTHFR y para el polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa, existe una relación positiva entre los genotipos con alelo mutado y la edad superior a seis años, si bien esta asociación no fue estadística significativa.

La extensión de la afectación epifisaria es otro de los factores pronóstico; a mayor extensión de la lesión epifisaria mayor probabilidad de colapso y deformidad, y peores resultados a largo plazo (artrosis precoz).

La clasificación radiológica de Catterall, sobre la extensión de la enfermedad continúa presentándose para algunos autores como Wiig (Wiig y cols., 2008) como el más importante predictor de evolución para los pacientes clasificados en los grupos III y IV. Por el contrario, este sistema de clasificación es difícil de aplicar en fases tempranas de la enfermedad (Van Dam BE y cols., 1981), debido a que se trata de un proceso biológico y

cambiante, con fases de duración asimétrica destacando especialmente corta la fase de fragmentación. Esto justificaría que en nuestra serie ninguno de los niños con enfermedad de Perthes tuviese un grado I de Catterall.

En nuestro estudio sólo un paciente con enfermedad de Perthes fue heterocigoto para el factor V Leiden (2,9%) y tenía una forma grave de Perthes (presentaba un grado IV Catterall), pero tras el análisis estadístico se detecta una relación negativa entre los genotipos con alelo mutado y los casos graves de enfermedad, pero sin que esta asociación fuera estadísticamente significativa (OR 0,5; IC95: 0,01 a 13,3). Un dato que se contrapone al expuesto por Szepesi (Szepesi K y cols., 2004), que sugiere que la forma homocigota de la mutación del Factor V Leiden puede jugar algún papel en el curso clínico de la enfermedad de Perthes, particularmente en las formas más severas.

Con relación a la MTHFR observamos que los 4 homocigotos mutados (TT) tenían una forma grave de Perthes, los 4 niños homocigotos para el polimorfismo tienen un grado IV Catterall. El único niño homocigoto mutado para la proteína PLA<sup>2</sup> (A<sup>2</sup>A<sup>2</sup>), tiene también un Catterall III.

La enfermedad de Perthes es más frecuente en varones; de hecho, en las series se describen que en una proporción de 5:1 (Perry DC y cols., 2011). En el presente estudio también se ha corroborado esta realidad pues un 87% de nuestros casos son varones; mientras que las alteraciones de la coagulación se distribuyen por igual entre los sexos. La diferencia en los

efectos de las alteraciones de la coagulación entre hombres y mujeres sugiere que las anomalías de coagulación tienen un mayor impacto en la circulación de las cabezas femorales de varones. Chung (Chung SM, 1976) describe que la anatomía de la vascularización alrededor de la cabeza femoral en niños es diferente de la de las niñas, lo que podría significar que, en el caso de trombofilia, la obstrucción venosa se produce más fácilmente en los niños que en las niñas. Otra explicación podría ser que los niños experimentan más traumatismos en edades más jóvenes. La formación de coágulos después del traumatismo en los vasos alrededor de la cabeza del fémur podría desencadenar coágulos más grandes cuando la trombofilia está presente, lo que llevaría a una mayor obstrucción del flujo sanguíneo y mayores daños en la cabeza del fémur.

Algunos investigadores (Joseph y cols., 2011), han sugerido que el pronóstico es peor en las niñas que en los niños, debido a que las niñas alcanzan la madurez esquelética antes que los niños, dejando menos tiempo para la remodelación de la cabeza femoral en la curación de la enfermedad. Sin embargo, no hay pruebas sólidas que sugieran que el pronóstico es peor en las niñas que en los niños. Nosotros observamos que el 100% de las niñas presentan un grado III/IV de Catterall y 83,3% de los niños está en esa categoría ( $\chi^2 = 0,976$ ;  $df:1$ ;  $p: 0,433$ ).

En nuestro estudio encontramos que para el polimorfismo C677T de la MTHFR existe una relación positiva entre el sexo varón y los genotipos CT ó

TT (OR: 2,1: IC95%:0,3 a 1,42) así como con la presencia del alelo T. No obstante, esta relación no alcanzó significación estadística.

Los objetivos del tratamiento de la enfermedad de Perthes son restaurar la movilidad articular, prevenir la deformidad de la cabeza femoral, evitar las alteraciones del crecimiento del fémur proximal y a largo plazo, la degeneración articular.

Para que el tratamiento sea efectivo, éste debe iniciarse en la fase inicial o de fragmentación, que es cuando la cabeza tiene aún capacidad plástica de remodelación o adaptación a la cavidad acetabular. Por lo tanto, antes de iniciar cualquier tratamiento debemos saber cómo es la evolución natural de la enfermedad y conocer cuáles son los signos clínicos y radiológicos de riesgo que hacen que derive a un mal resultado. En definitiva, debemos saber si nuestra actuación terapéutica superará la evolución natural de este proceso.

En el enfoque terapéutico influyen por tanto diversas variables, los denominados factores pronósticos, que ya comentamos en la introducción, que nos orientarán a la hora de adoptar una actitud quirúrgica o conservadora. Estos factores son: edad al comienzo de la enfermedad (> 6 años, peor pronóstico), extensión de la afectación epifisaria (mal pronóstico los grados Catterall III y IV), la presencia radiográfica de los signos de cabeza de riesgo de Catterall y el estadio de la enfermedad en que se inicia el tratamiento.

En el presente trabajo el 61% de los niños fueron intervenidos quirúrgicamente, pero esta cifra no es comparable con otros trabajos debido a todas las variables anteriores, que entran en juego a la hora de la decisión terapéutica y que en cada estudio son diferentes.

En nuestra casuística el 87,8% de los enfermos presentan un grado III ó IV en la clasificación de Catterall, que justifica esa tasa elevada de cirugías.

El grado de deformidad de la cabeza femoral y su congruencia con el acetábulo al final de la madurez esquelética, nos va a condicionar el resultado. A mayor deformidad epifisaria e incongruencia, peores resultados a largo plazo (artrosis precoz).

Tal como se describe en el apartado introducción, con el fin de disponer de una medida objetiva de dicha situación funcional se desarrolló la clasificación de Stulberg. En nuestra serie el 65% de los niños evolucionaron de modo favorable (Stulberg I-II). Resaltamos que los niños varones intervenidos presentan de modo significativo mejor evolución que las niñas intervenidas.

No se detectó que hubiera un mayor riesgo entre la cirugía y la evolución funcional (OR 1,4, IC95% 0,3 a 7,7), lo cual está limitado por el tamaño muestral. Nos concuerda con el hecho, de que el enfoque quirúrgico no va asociado con una mejor evolución, de ahí que las estrategias terapéuticas incluyan con igual validez cirugía o tratamientos conservadores de contención, dependiendo de cada caso individualmente.

Estudiamos, a continuación, como se distribuían los genotipos y de las frecuencias alélicas de la mutación G1691A del factor V (Factor V Leiden), la mutación G20210A de la protrombina, la mutación C677T de la MTHFR y el polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa, comparando los 41 enfermos de Perthes con 118 controles sanos.

\* Polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa

Se observa, aunque de forma no estadísticamente significativa, que existe un mayor riesgo de enfermedad de Perthes en aquellos que eran homocigotos para el alelo mutado o heterocigotos respecto a sujetos con genotipo normal (OR 1,3; IC95%: 0,6 a 2,8). En la misma línea, la prevalencia de alelos mutados fue de 17,1% (IC95% 10,5 a 26,6) en los casos y 14,4% (IC95% 10,5 a 19,5) en los controles. La OR del alelo A2 frente al alelo A1 es de 1,22 (IC95% 0,6 a 2,4) lo que sugiere que el riesgo de tener Perthes fue 1,2 veces más elevada con el alelo A<sup>2</sup> que con el alelo A<sup>1</sup>, pero esto tampoco fue estadísticamente significativo.

Por lo tanto, en nuestro estudio no hemos encontrado relación entre este polimorfismo y la enfermedad de Perthes.

\* Mutación del factor V (Factor V Leiden)

La prevalencia de alelos mutados para mutación del factor V de la coagulación (Factor V Leiden) es del 1,2% (IC95% 0,1 a 2,4) en los casos y 0,4% (IC95% 0,1 a 0,7) en los controles. La OR de A frente G es de 2,9 (IC95% 0,2 a 46,9) lo que sugiere que el riesgo de tener Perthes fue 2,9 veces más elevada con el alelo A que con el alelo G. Se objetivó que ser heterocigoto para el Factor V, incrementa el riesgo de Perthes un 2,93 veces (OR 2,93; IC95% 0,2 a 47,8). Resultados que coinciden con los del estudio realizado por Woratanarat y cols. (Woratanarat y cols.,2014), en el que llevaron a cabo una revisión sistemática y realizaron un metaanálisis para determinar la asociación entre el factor V Leiden, protrombina II y polimorfismos de MTHFR y la enfermedad de Perthes. Incluyeron 12 estudios de casos y controles en el análisis con un total 824 casos y 2.033 controles. Ellos encuentran que la prevalencia combinada de alelos A fueron 5,8% (IC95% 3,8%, a 7,7%) y 1,5% (IC 95% 0,8% a 2,3%) en los casos y controles, respectivamente. La OR agrupado de A frente a G con el modelo de efectos aleatorios es 3,10 (IC95% 1,68 a 5,72), lo que sugiere que las probabilidades de tener la enfermedad de Perthes fue 3.10 veces significativamente mayor con el alelo A que con el alelo G.

Si bien nuestro resultado no fue estadísticamente significativo, podemos decir que observamos una relación entre el factor V Leiden y la enfermedad de Perthes, como ya comunicaron otros autores, (Balasa VV y cols., 2004;

Kenet y cols., 2008; Vosmaer A y cols.,2010). Glueck y cols. (Glueck CJ y cols., 1996) que detectaron anomalías de la coagulación en el 75% de sus pacientes con enfermedad de Perthes y sugirieron que la trombofilia podía producir una oclusión venosa en el cuello femoral, un aumento de la presión venosa y la osteonecrosis de la cabeza femoral característica de la enfermedad de Perthes. Posteriormente los mismos autores (Glueck CJ y cols., 1997) encontraron que la resistencia a la proteína C activada debido a la mutación del Factor V Leiden, era una causa de la enfermedad de Perthes.

Otros autores, sin embargo, no han hallado esta asociación (Thomas DP y cols., 1999; Sirvent N y cols., 2000; Hresko y cols., 2002), en nuestro país López Franco ( López Franco M y cols., 2005) no encuentran relación entre los estados de hipercoagulabilidad causados por las mutaciones Factor V Leiden , gen de la protrombina y gen de la metilentetrahidrofolato reductasa y la enfermedad de Perthes , por lo que descartan la necesidad de realizar un despistaje de este grupo de polimorfismos en los pacientes con enfermedad de Perthes .

\* Mutación G20210A de la protrombina.

Respecto a la mutación G20210A de la protrombina, en el estudio de Woratanarat encuentran que la prevalencia combinada del alelo A es 2,3% (IC95% 1,6% a 3%) entre los casos, y el 1,2% (IC95% 0,8% a 1,7%) entre los controles. El OR agrupado es de 1,48 (IC95% 0,71 a 3,08), que sugiere

que el alelo A lleva un 50% más de riesgo de la enfermedad de Perthes en comparación con el alelo G. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa probablemente debido a la baja frecuencia del alelo y el pequeño tamaño de la muestra. En nuestra serie, todos los enfermos de Perthes y la mayoría de los controles fueron homocigotos GG para el polimorfismo G20210A de la protrombina. Tan solo 4 casos de los controles y ninguno de los casos fueron heterocigotos GA para ese polimorfismo. No se detectaron casos homocigotos AA. Esto puede ser debido al pequeño tamaño muestral, con lo que no encontramos relación entre éste polimorfismo y la enfermedad de Perthes, coincidiendo con autores como Balasa y cols. ( Balasa y cols., 2004 ) que encuentran que dos factores de riesgo trombofílico , la mutación del Factor V Leiden y los anticuerpos cardiolipina, se asocian en su serie con la enfermedad de Perthes , y esta asociación puede reflejar causalidad, pero no encuentran relación entre la enfermedad de Perthes y las mutaciones del gen de la protrombina ni del gen de la MTHFR.

### \* Mutación C677T de la MTHFR

Finalmente, en cuanto a la mutación C677T de la metilentetrahidfolato reductasa, en nuestra serie la prevalencia de alelos mutados es de 32,9% (IC95% 23,7 a 43,6), en el grupo de los casos y 36% (IC95% 30,2 a 42,3) en los controles y la OR de T frente A es de 0,87 (IC95% 0,51 a 1,40), lo que indicaba que no encontramos asociación entre el polimorfismo MTHFR y la

enfermedad de Perthes. Resultados bastante similares a los encontrados en el meta-análisis de Woratanarat y cols (Woratanarat y cols, 2014) donde la prevalencia del alelo T menor en los grupos de casos y de control es muy similar, es decir, 10,4% (IC95% 4,6% a 16,2%) y 10,5% (IC95% 4,4% a 16,7%). El OR para T frente a C alelos es homogénea con el OR agrupado de 0,97 (IC95% 0,72 a 1,30).

Existen evidencias de que el remodelado de la matriz extracelular puede ser importante en procesos ligados a mineralización y necrosis de la cabeza femoral (Hofstaetter y cols.,2010). En este sentido, niveles elevados de homocisteína o disregulación del ciclo metionina-homocisteína asociado a las variantes polimórficas del enzima MTHFR pudieran aumentar la incidencia de enfermedad de Perthes o condicionar diferencias en los patrones de recuperación de la cabeza necrosada. Aunque el polimorfismo C677T se ha asociado clásicamente con eventos vasculares o isquémicos, habida cuenta que no existe asociación con ninguna otra variable genética proagregante, debemos considerar el posible efecto sobre el remodelado de la matriz extracelular.

Se podría pensar que la actividad aumentada de MTHFR puede inducir una expresión diferencial de metaloproteasas de matriz que condicionan cambios en el remodelado tisular y contribuyendo en la patogénesis de la enfermedad de Perthes. Las metaloproteasas de matriz son una clase de proteasas

implicadas en el remodelado tisular bajo determinadas condiciones fisiológicas como patológicas.

En nuestro estudio encontramos que los 4 niños homocigotos mutados para la MTHFR tienen una forma grave de la enfermedad (grado IV de Catterall) lo cual nos lleva a suponer que dicha mutación podría estar relacionada con la gravedad de la enfermedad.

Debido al diseño del estudio no disponemos de niveles de homocisteína (el reclutamiento de los niños se hizo en diferentes momentos y no disponíamos de muestra de sangre al diagnóstico), pero existe una probada relación entre la variante mutada de la MTHFR y la hiperhomocisteinemia leve-moderada. Se ha sugerido que la agresión a las células endoteliales provocada por las especies reactivas de oxígeno durante la autooxidación de la homocisteína en el plasma, o bien un efecto citotóxico directo, puede ser el mecanismo inicial por el cual la hiperhomocisteinemia causa arteriosclerosis y trombosis, así como interfiere en el remodelado tisular (Welch GN y cols., 1998; Derouiche F y cols., 2014).

En nuestro estudio podemos concluir que ninguno de los factores genéticos de trombofilia es un factor de riesgo evidente para padecer una enfermedad de Perthes. Sin embargo, la presencia de las variantes mutadas para la MTHFR y PIA<sup>2</sup> aumentan de forma significativa el riesgo de manifestar una forma grave de esta enfermedad. Ambos factores de trombofilia están relacionados directamente con los mecanismos de remodelado tisular y/o de

reparación de la matriz extracelular. La caracterización para estos factores en el momento del diagnóstico permitiría anticipar una forma grave de enfermedad de Perthes, y podrían ser de utilidad a la hora de diseñar las diferentes estrategias terapéuticas en esta enfermedad.

Futuros estudios multicéntricos nos permitirían evaluar la asociación entre la enfermedad de Perthes y los mecanismos de activación plaquetaria y liberación de sustancias en el espacio extracelular, que son determinantes de los mecanismos de daño y reparación tisular y, por lo tanto, están implicados en la patogénesis de la enfermedad de Perthes.

## Conclusiones

## **6. Conclusiones**

- 1) En nuestra serie de niños con enfermedad de Perthes la edad media al diagnóstico es de 5,2 años con un predominio de varones sobre mujeres en una proporción 7:1. El 87% de casos tiene una importante afectación epifisaria, están en un grado III-IV de la clasificación de Catterall (100% de las niñas y 83,3% de los niños). Al final del seguimiento el 65,9% de los pacientes presentaron una evolución favorable, clase I-II Stulberg (40% de las niñas y 69,4% de los niños).
- 2) Respecto a las variables genéticas estudiadas y su posible relación con la evolución de la enfermedad, todos los niños homocigotos para la mutación C677T del gen para la MTHFR presentan una forma grave de enfermedad de Perthes (grado IV de Catterall) y los niños homocigotos para el polimorfismo PLA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa también presentan al diagnóstico una forma grave de enfermedad de Perthes (grado III de Catterall).
- 3) Ni la presencia del factor V Leiden ni la mutación G20210A en el gen de la protrombina, ambos identificados como de riesgo de trombofilia, se asocian con una mayor gravedad de la enfermedad de Perthes al diagnóstico.
- 4) Entre los pacientes con enfermedad de Perthes, la distribución de las variantes polimórficas G1691A del factor V de Leiden, G20210A del gen de la protrombina y C677T del gen para la MTHFR, que

condicionan un mayor riesgo de trombosis, no difiere de la encontrada en la población normal. No encontramos, por lo tanto, una asociación entre los polimorfismos habituales que condicionan un mayor riesgo trombótico y riesgo de enfermedad de Perthes.

- 5) Tampoco encontramos relación entre la presencia del polimorfismo PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa y el riesgo de padecer enfermedad de Perthes.
- 6) De acuerdo con nuestros resultados, la respuesta de la matriz extracelular a los procesos de daño endotelial o de activación plaquetaria pueden condicionar una mayor gravedad en la enfermedad de Perthes de acuerdo a la clasificación de Catterall. La condición de homocigoto mutado, bien para la variante C677T de la MTHFR, que puede interferir con las metaloproteinasas de matriz extracelular, o para la variante PIA<sup>2</sup>/PIA<sup>2</sup> de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa, integrina relacionada con el remodelado de matriz, pueden indicar un riesgo de presentar una forma grave de enfermedad de Perthes.

Anexos

## 7. Anexo I

### Hoja de recogida de datos

- NOMBRE:

- N.H.C:

- SEXO:

- FECHA DEL DIAGNÓSTICO:

- EDAD AL DIAGNÓSTICO:

- ANTECEDENTES PERSONALES:

- ANTECEDENTES FAMILIARES:

Sucesos tromboembólicos precoces (menores 55 años)

\* Trombosis venosa profunda    \* Infarto agudo de miocardio;

\* Accidente cerebrovascular    \* Embolismo pulmonar

- LADO INICIAL: Derecho    Izquierdo

- BILATERALIDAD: SI    NO

Edad de inicio del Perthes en la otra cadera.

- FASE AL DIAGNÓSTICO:

- CLASIFICACION: \* CATERALL I II III IV

\* HERRING A B B/C C

- EVOLUCIÓN CLÍNICA:

- EVOLUCIÓN RADIOLOGICA:

- TRATAMIENTO:    \* OBSERVACIÓN    \* CIRUGÍA

- RESULTADO FINAL: STULBERG I II III IV V



## 9. Anexo III

### Estudio AVENA

**Nutrición  
Hospitalaria**

Nutr. Hosp. (2003) XVIII (1) 15-28  
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ  
S.V.R. 318

Original

### Alimentación y valoración del estado nutricional de los adolescentes españoles (Estudio AVENA). Evaluación de riesgos y propuesta de intervención. I. Descripción metodológica del proyecto\*

The AVENA group\*\*

\* Proyecto financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo).

\*\* Esta publicación fue preparada para el grupo AVENA por: M. González-Gross, M. J. Castillo, L. Moreno, E. Nova, D. González-Lamuño, F. Pérez-Llamas, A. Gutiérrez, M. Garaulet, M. Joyanes, A. Leiva y A. Marcos (ver Grupo AVENA en apéndice).

#### Resumen

**Antecedentes:** La adolescencia es una etapa decisiva en el desarrollo humano por los múltiples cambios fisiológicos y psicológicos que en ella ocurren los cuales, a su vez, condicionan tanto las necesidades nutricionales como los hábitos de alimentación, actividad física y comportamiento. Además, está demostrado que estos hábitos tienen repercusión en el estado de salud en la vida adulta. El interés de este tema así como su apropiado desarrollo ha merecido una financiación por parte del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III.

**Objetivo:** Desarrollar una metodología que evalúe el estado de salud así como la situación nutricional-metabólica y forma física de una muestra representativa de adolescentes españoles. Especial atención se prestará a tres tipos específicos de patologías como son obesidad, anorexia nerviosa/bulimia, dislipidemia.

**Metodología:** Para alcanzar el objetivo, se van a estudiar ocho tipos diferentes de magnitudes: 1) ingesta dietética, hábitos alimentarios y conocimientos nutricionales; 2) actividad física habitual y actitud frente a la práctica físico-deportiva; 3) nivel de condición física; 4) antropometría y composición corporal; 5) estudio hematobioquímico: perfil fenotípico lipídico y metabólico, estudio hematológico; 6) perfil genotípico de factores lipídicos de riesgo cardiovascular; 7) perfil inmunológico de estado nutricional; 8) perfil psicológico.

**Conclusión:** Este proyecto incluye la actividad coordi-

#### FEEDING AND ASSESSMENT OF NUTRITIONAL STATUS OF SPANISH ADOLESCENTS (AVENA STUDY). ASSESSMENT OF RISKS AND INTERVENTION PROPOSAL

#### Abstract

**Background:** Adolescence is a decisive period in human life due to the multiple physiological and psychological changes that take place. These changes will condition both nutritional requirements and eating/physical activity behavior. It has been demonstrated that these "adolescence" factors are of significant influence in health status during adult life. Due to its importance and adequate development the project has been granted by the Fondo de Investigación Sanitaria of the Institute of Health Carlos III.

**Objective:** To develop a methodology to evaluate the health and nutritional status of a representative population of Spanish adolescents. Specific attention is paid to three specific health problems: obesity, anorexia nervosa/bulimia, dislipidemia.

**Methodology:** The following magnitudes will be studied: 1) dietary intake, food habits and nutrition knowledge; 2) daily physical activity and personal approach; 3) physical condition; 4) anthropometry and body composition; 5) hematobiochemical study: plasma lipid phenotypic and metabolic profile, blood cell counts; 6) genotypic profile of cardiovascular risk lipid factors; 7) immune function profile related to nutritional status; 8) psychological profile.

**Conclusion:** This project includes the co-ordinate activity of five Spanish centers of five different cities (Granada, Madrid, Murcia, Santander, Zaragoza). Each center is specialized in a specific area and will be responsible for the corresponding part of the study. From the data obtained, we will elaborate a specific intervention program in order to improve nutrition and neutralize the risk for nutritional related problems in adolescence. By this, we will contribute to improve the

**Correspondencia:** Dra. Ascensión Marcos.  
Instituto de Nutrición y Bromatología CSIC-UCM.  
Edificio Instituto del Frío.  
Ramiro de Maeztu, s/n.  
E-28040 Madrid, España.  
Tel.: + 34 915 49 00 38  
Fax: + 34 915 49 50 79  
Correo electrónico: amarcos@inb.cisc.es

Recibido: 7-I-2002.  
Aceptado: 12-IV-2002.

nada de cinco centros españoles situados en otras tantas ciudades (Granada, Madrid, Murcia, Santander, Zaragoza). Cada uno de esos centros tiene larga y acreditada experiencia en la parte del estudio de la que es responsable. En función de los resultados obtenidos, se propondrá un programa específico de intervención que permita mejorar la alimentación y neutralizar el riesgo que, para las patologías antes mencionadas, existe entre los adolescentes españoles. Con ello se pretende contribuir a mejorar el estado de salud de la población española del nuevo milenio.

(*Nutr Hosp* 2003, 18:15-28)

Palabras clave: *Adolescencia. Anorexia. Dislipidemia. Ejercicio físico. Nutrición. Obesidad. Salud.*

## Introducción

La adolescencia es una etapa crucial en el desarrollo de la persona e implica múltiples cambios fisiológicos y psicológicos. Unos y otros influyen sobre el comportamiento, necesidades nutricionales y hábitos alimentarios. La adolescencia se caracteriza por un intenso crecimiento y desarrollo, hasta el punto que se llega a alcanzar, en un período relativamente corto de tiempo, el 50% del peso corporal definitivo<sup>1</sup>. A esto contribuye también el desarrollo sexual, el cual va a desencadenar importantes cambios en la composición corporal del individuo<sup>2</sup>. En consecuencia, las necesidades de energía y nutrientes van a ser superiores en la adolescencia que en las restantes etapas de la vida<sup>3</sup>. Los cambios psicológicos tienden a afectar a los patrones dietéticos y de actividad física, algo a tener muy en cuenta, puesto que hoy día la mayoría de los adolescentes del medio urbano controlan su propia dieta y el nivel de actividad física que practican<sup>4</sup>. Esto puede conducir a la adquisición de unos hábitos inadecuados que, en la mayoría de los casos, se mantienen a lo largo de la vida adulta con el consiguiente riesgo o beneficio para la salud<sup>4,5</sup>. Por otro lado, la presencia de ciertos factores y hábitos de riesgo ya durante la niñez y la adolescencia incrementa de forma notable la probabilidad de desarrollar ciertas patologías en la vida adulta. Estas patologías incluyen: dislipidemia/aterosclerosis<sup>6,9</sup>, trastornos del comportamiento alimentario, obesidad/diabetes<sup>10-12</sup> osteoporosis<sup>13</sup>, ciertos tipos de cáncer<sup>14</sup>, etc.

La iniciativa del presente proyecto coordinado de investigación surge al observar que la problemática de un consumo inadecuado de alimentos junto con los trastornos del comportamiento alimentario, inactividad física, etc., está afectando, cada vez más tempranamente, a una creciente población infantil y juvenil. A esto se suma la necesidad de caracterizar adecuadamente la situación. Para ello, es necesario obtener datos representativos de la población española que sean comparables entre sí y poder actuar en consecuencia.

health status of the Spanish population in the new millennium.

(*Nutr Hosp* 2003, 18:15-28)

Keywords: *Adolescence. Anorexia. Dislipidemia. Health. Nutrition. Obesity. Physical exercise.*

## Objetivo general del proyecto

El proyecto AVENA tiene dos objetivos principales:

1. Evaluar el estado de salud, los hábitos de comportamiento y la situación metabólico-nutricional de una muestra representativa de adolescentes españoles con especial referencia al riesgo de padecer tres tipos específicos de patologías característicos de la adolescencia como son obesidad, anorexia nerviosa/bulimia, dislipidemia.
2. En función de los resultados obtenidos, proponer un programa específico de intervención que permita neutralizar el riesgo, que para las patologías antes mencionadas, existe entre los adolescentes españoles y contribuir así a mejorar el estado de salud de la población española del nuevo milenio.

## Material y métodos

### *Población objeto del estudio*

Para este estudio, se considera que la opción válida que ofrece fiabilidad (en cuanto a comparación) y viabilidad (en cuanto a su realización práctica) es la captación de la población objeto de estudio a través de los centros de enseñanza. Con objeto de abarcar la heterogeneidad de la población, se decide que el estudio se realice tanto en centros públicos como privados de Enseñanza Secundaria o Formación Profesional. Se elige el rango de edad de 13 a 18 años por ser cuando se establecen definitivamente los hábitos de estilo de vida, al producirse el alejamiento de la estrecha vinculación familiar que ha estado presente durante la infancia.

### *Tamaño de la muestra*

Para establecer el tamaño de la muestra, se han empleado los datos sobre población española del Instituto Nacional de Estadística (1996) (tabla I). Tras hacer un estudio descriptivo de las variables, se llega a la

**Tabla I**  
 Datos de la población española. Instituto Nacional  
 de Estadística 1996

Santander			
Población total: 184.869 → 8,6% <sup>13-17</sup>			
	Total	Hombres	Mujeres
13-17	16.013	8.166	7.847
Granada			
Población total: 241.471 → 8% <sup>13-17</sup>			
	Total	Hombres	Mujeres
13-17	19.318	9.852	9.466
Murcia			
Población total: 349.040 → 7,4% <sup>13-17</sup>			
	Total	Hombres	Mujeres
13-17	25.891	13.650	12.241
13	4.560	2.347	2.213
14	4.773	2.457	2.316
15	5.270	2.687	2.583
16	5.419	3.024	2.845
17	5.869	3.135	2.844
Zaragoza			
Población total: 603.367 → 6,4% <sup>13-17</sup>			
	Total	Hombres	Mujeres
13-17	39.110	19.874	19.236
13	6.949	3.637	3.312
14	7.306	3.680	3.626
15	7.911	4.158	3.753
16	8.444	4.199	4.245
17	8.500	4.200	4.300
Madrid			
Población total: 2.866.850 → 5,7% <sup>13-17</sup>			
	Total	Hombres	Mujeres
13-17	163.924	83.570	80.354
13	28.981	14.843	14.138
14	30.298	15.341	14.957
15	32.282	16.448	15.834
16	34.810	17.763	17.047
17	37.553	19.175	18.378

conclusión que para la variable que tiene más varianza (IMC = índice de masa corporal)<sup>15, 16</sup>, la diferencia entre la media estimada y la media real no difiere en más del 2% para un tamaño muestral de 1.750, con una probabilidad del 95%, estando el resto de las variables para este tamaño muestral perfectamente encuadradas. Los investigadores de AVENA han apostado desde los inicios por la optimización máxima de todos los recursos. Por tanto, se ha elegido el tamaño de muestra mínimo necesario para poder alcanzar los objetivos que se pretenden.

#### Método general del estudio

Se utiliza un modelo de estudio transversal, con un muestreo aleatorio representativo de la población adolescente española.

Se procede a tomar los siguientes datos: 1) ingesta dietética, hábitos alimentarios y conocimientos nutricionales; 2) actividad física habitual y actitud frente a la práctica físico-deportiva; 3) nivel de condición física; 4) antropometría y composición corporal; 5) estudio hemato-bioquímico: estudio hematológico, perfil fenotípico lipídico y metabólico; 6) perfil genotípico de factores lipídicos de riesgo cardiovascular; 7) perfil inmunológico de estado nutricional; 8) perfil psicológico.

En el estudio dietético, antropométrico, actividad/condición física y aspectos psicológicos participa el total de la muestra de adolescentes (1.750 individuos). Los estudios hematológico, bioquímico, genético e inmunológico se realizarán en 500 individuos elegidos al azar pero constituyendo una muestra representativa.

Una vez establecidos los objetivos y el método general del proyecto, y tras disponer de la necesaria financiación por parte del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), se ha profundizado en los aspectos metodológicos para que éstos fueran, a la vez, fiables y operativos. Tras diversas discusiones en grupo y, en su caso, la realización del estudio piloto pertinente, se ha llegado a la conclusión de que la metodología específica a emplear en cada parte del estudio que consigue garantizar el desarrollo del proyecto multicéntrico es la que se describe a continuación. En el presente trabajo se presentan específicamente las conclusiones metodológicas a las que se ha llegado respecto a los métodos a emplear relativos a estudio dietético, antropométrico, actividad/condición física, estudios hemato-bioquímico, genético, inmunológico y aspectos psicológicos. Igualmente se presentan los resultados obtenidos respecto al muestreo que es preciso realizar, metodología estadística a emplear, control de calidad y aspectos éticos.

## Resultados

### Grupo de muestreo

Estratos definidos por factores de variabilidad

a) *Procedencia*: se selecciona —considerando la cuestión técnica principal de la necesidad de contar con un equipo investigador— cinco ciudades españolas de más de cien mil habitantes situadas en puntos separados de la geografía española: Santander, Granada, Murcia, Zaragoza y Madrid.

b) *Condiciones socioeconómicas*: La selección muestral, una vez determinado el número de jóvenes que va a ser entrevistado y analizado, se realiza mediante sorteo de colegios clasificados a su vez por la pertenencia a las zonas en que se divide cada municipio, considerando que la proporcionalidad en número de colegios/zona lleva asociada la proporcionalidad en número de estudiantes/zona según el tramo de edad elegido en el estudio. La información sobre los centros educativos fue facilitada por las respectivas con-

cejalfías de educación de los ayuntamientos, y en el caso de Madrid, por la Conserjería de Educación de la Comunidad de Madrid (tabla II). No se ha estratificado por tipo de colegio: público, concertado, privado porque el interés principal está en asegurar la representatividad socio-económica la cual está mejor determinada por zona de residencia-lugar de escolarización, que por tipo de colegio. Aun así se ha asegurado la presencia de al menos un colegio estrictamente privado en cada ciudad.

c) *Sexo*: No se ha realizado ninguna selección por sexos. De hecho, para facilitar el muestreo y que éste sea lo más fiable y objetivo posible, así como por razones pedagógicas, psicológicas y operativas, en los colegios seleccionados considerado clases completas de la edad asignada. Es posible que con este tipo de muestreo no se cumplan en todas ellas, las proporciones mujer/hombre calculadas. En ese caso, los análisis estadísticos posteriores se corregirán mediante tratamiento ponderado.

e) *Edad*: se establecen los siguientes estratos de edad: 13-14, 14-15, 15-16, 16-17, 17-18. Se entrevista a clases completas que, por definición escolar, teóricamente se relacionan con una edad. Esto no quiere decir que todos los individuos de la clase cumplan la condición, puede haber repetidores o desplazados respecto a la mayoría, por otras razones. No obstante todos los alumnos serán objeto de entrevista y, nuevamente, las cuotas de edad se ajustarán en el tratamiento estadístico por un sistema de ponderación.

*Criterios de exclusión*: Se establecen como criterios de exclusión los siguientes: diagnóstico clínico de diabetes, embarazo, abuso de alcohol o drogas y en general patologías que no estén relacionadas directamente con la nutrición. La exclusión efectiva del estudio será aplicada a posteriori, sin conocimiento por parte de los alumnos, para evitar situaciones no deseadas. En consecuencia, todos los alumnos serán estudiados en base al tipo de estudio que corresponda.

#### *Ingesta dietética, hábitos alimentarios y conocimientos nutricionales*

Actualmente, *la encuesta alimentaria* es el principal instrumento utilizado para conocer el consumo alimentario y consiste en estimar cuál es la cantidad ingerida de todos y cada uno de los nutrientes durante un tiempo determinado. La encuesta alimentaria puede ser de varios tipos. Para el presente estudio, se han desarrollado o seleccionado tres tipos de encuesta alimentaria, con el fin de limitar al máximo las fuentes de error: recordatorio de 24 horas, registro dietético de 7 días y cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos<sup>17</sup>.

*Recordatorio de 24 horas*: como su nombre indica se trata de una anamnesis de lo ingerido en las 24 horas precedentes. Para el presente proyecto, dada la complejidad que conlleva, se decide realizar el *Recordatorio de 24 horas* en clase, con el apoyo del investi-

**Tabla II**  
*Centros educativos por zonas urbanas en las cinco ciudades*

<i>Ciudad</i>	<i>Zonas</i>	<i>Número de colegios</i>
Santander: 33 colegios		
	Valdenoja-Sardinero	4
	Reina Victoria-Castelar	7
	Centro	11
	Castilla-Hermida-Pesquero	3
	Albericia-Alisal-Peñac	8
Granada: 80 colegios		
	Zaidín	11
	Ronda	11
	Albayzin	6
	Beiro	7
	Centro	19
	Chana	10
	Genil	5
	Norte	11
Murcia: 37 colegios		
	Noroeste	9
	Norte	3
	Noreste	3
	Oeste	2
	Centro	6
	Este	7
	Sur	2
	Sureste	5
Zaragoza: 96 colegios		
	Zona 1	8
	Zona 2	8
	Zona 3	5
	Zona 4	3
	Zona 5	34
	Zona 6	18
	Zona 7	10
Madrid: 460 colegios		
	Centro	41
	Arganzuela	8
	Retiro	16
	Salamanca	29
	Chamartín	39
	Tetuán	14
	Chamberí	31
	Fuencarral-El Pardo	20
	Moncloa-Aravaca	31
	Latina	33
	Carabanchel	27
	Usera	17
	Puente de Vallecas	29
	Moratalaz	13
	Ciudad Lineal	38
	Hortaleza	21
	Villaverde	14
	Villa de Vallecas	9
	Vicálvaro	7
	San Blas	18
	Barajas	5

gador, con el fin de que el entrevistado recuerde y anote minuciosamente las comidas realizadas el día anterior. La finalidad del recordatorio de 24 horas será principalmente la de servir como elemento de aprendizaje para rellenar correctamente el cuestionario de registro dietético de 7 días.

*Registro dietético de 7 días:* se trata de la anotación a lo largo de una semana de los alimentos ingeridos tanto en cuanto al tipo como a la cantidad de sus componentes. Esto último se hace por estimación. Para ello, cada individuo recibe unas tablas de referencia de pesos aproximados de alimentos con el objeto de facilitarles la labor, y al mismo tiempo disminuir el error en la estimación de las cantidades de alimentos ingeridos. Estas tablas de referencia han sido elaboradas por el equipo investigador tras hallar la media después de pesar varias veces el mismo alimento, y ser contrastadas con las tablas de referencia de Alcoriza y cols.<sup>18</sup>. En ausencia de algún dato, se utilizan los ingredientes estándar de las principales recetas españolas<sup>19</sup>, así como los componentes de las distintas formas de cocinado tradicional de las raciones<sup>18,20</sup>. Una vez se complete el registro semanal, tiene que ser repasado por el nutricionista junto con el sujeto. A continuación, el investigador es el encargado de pasar a gramos la información obtenida. La transformación a energía y nutrientes se realiza mediante tablas de composición de alimentos españoles<sup>21-23</sup> y con una aplicación informática elaborada por el grupo investigador.

*Frecuencia de consumo de alimentos:* Este cuestionario<sup>17</sup> complementa la información obtenida. Además, es el método más fácil para tipificar el consumo habitual de alimentos durante el último año, y es útil para determinar el consumo habitual de alcohol y bebidas. Para el estudio AVENA, este cuestionario será autocontestado y semicuantitativo, y se realiza, al igual que el resto de recogida de datos, estando presente los investigadores en el aula.

Para evaluar los *conocimientos nutricionales* de los sujetos objeto del estudio, se utiliza un cuestionario con preguntas abiertas y otras cerradas, de acuerdo con los criterios de los trabajos de Pro y Bannet<sup>24</sup>. Este cuestionario también se pasará en el aula.

### Actividad y condición física

El estudio de la relación entre la actividad física, la condición física y la salud atiende a dos modelos diferentes<sup>25-27</sup>: el primero, relaciona la actividad física directamente con la salud, preocupándose por la adopción de hábitos de vida saludables a través del estudio de factores psicosociales que condicionan la adherencia a los programas de actividad física<sup>28</sup>. El segundo modelo relaciona la práctica de la misma con la salud a través de la mediación que se produce en la mejora de la condición física, gracias a los cambios morfológicos y funcionales que se producen. En consecuencia, las variables a estudiar se dividen en tres grandes grupos que son: a) nivel de actividad física que habitualmente rea-

liza el sujeto; b) actitudes, motivaciones, valores y comportamientos hacia la actividad física y el deporte; c) nivel de condición física orientada a la salud. Los dos primeros aspectos se han de valorar mediante cuestionarios, el tercero se valora mediante tests de campo.

#### A. Nivel de actividad física habitual

Se evalúa a partir del índice de actividad física obtenido al considerar tipo, duración (mínimo de 12 minutos) y frecuencia de actividades físicas y deportivas realizadas durante un día laboral, un día de fin de semana y práctica de actividad física de vacaciones<sup>29,30</sup>. Este índice ha sido validado previamente a partir del registro de la frecuencia cardíaca minuto a minuto mediante el Polar Sport Tester 4000 durante un período de 12 horas en un día laboral en niños/as de 10 años<sup>31</sup> y actualmente está siendo validado para las edades de la población a estudio. Para el estudio AVENA, se hará a partir de un grupo de tres cuestionarios, en forma de recordatorio de las actividades físico-deportivas realizadas, enumeradas en una serie de categorías atendiendo al nivel de gasto energético (MET)<sup>32,33</sup>.

#### B. Actitudes, motivaciones, valores y comportamientos hacia la actividad física y el deporte

La valoración del comportamiento hacia la actividad física y el deporte, condicionado por las actitudes, motivaciones y valores que se tienen sobre la misma, se realiza a partir de un cuestionario elaborado específicamente para el estudio AVENA, el cual ha sido sometido a un proceso de validación y fiabilidad en las diferentes edades del estudio. Este cuestionario ha sido construido atendiendo a una síntesis realizada a partir de herramientas ya utilizadas en la bibliografía, aportaciones del propio grupo de investigación y estudios experimentales realizados por los propios investigadores del proyecto. Con ello se valora:

a) Actitudes, intereses y valores hacia la actividad física y el deporte, mediante los ítems correspondientes de la encuesta de García Ferrando<sup>34</sup>.

b) Motivaciones y causas de abandono hacia la práctica de actividad físico-deportiva, mediante la misma técnica y los ítems del cuestionario de Mendoza y cols.<sup>35</sup>.

c) Actitudes hacia el proceso y el producto relacionadas con la salud, a partir del cuestionario de actitudes de actividad física orientada a la salud de Pérez Samaniego<sup>36</sup>.

d) Percepción de la utilidad de la práctica de actividad física y el deporte hacia la salud, valorada a partir del diferencial semántico de Sánchez Bañuelos<sup>37</sup>.

#### C. Condición física orientada a la salud

Se evalúa la fuerza, velocidad, resistencia y movilidad articular, consideradas como las cualidades físicas básicas<sup>38</sup> a través de las siguientes capacidades:

— Resistencia cardiorrespiratoria (aerobia). Capacidad para mantener un esfuerzo prolongado en el tiempo gracias a procesos metabólicos de carácter fundamentalmente aerobio.

— Fuerza y resistencia muscular. Capacidad del componente muscular para generar tensión durante un tiempo determinado.

— Amplitud de movimiento. Capacidad del sistema músculo-esquelético para generar movimientos articulares de gran recorrido o amplitud, gracias a las propiedades de movilidad articular, elasticidad muscular y elongación músculo-ligamentosa.

— Coordinación, agilidad y velocidad de movimiento. Capacidad para generar movimientos balísticos y explosivos, implicando gestos finos y cambios de dirección y ritmo de carrera.

Para ello, se han seleccionado 6 pruebas integradas dentro de la batería EUROFIT<sup>39</sup>, validada y estandarizada por el Consejo de Europa, siguiendo el orden propuesto.

a) *Flexión de tronco adelante en posición sentado (FLT)*, mediante un test de amplitud articular sentado en el suelo. Se trata de alcanzar la máxima distancia posible en flexión anterior de tronco, medida a través de un soporte estandarizado. Medimos movilidad articular de tronco y cadera, como articulación representativa de la condición global del sujeto<sup>40</sup>.

b) *Salto de longitud sin impulso (SLO)*, en la que determina la máxima distancia alcanzada en dos intentos. Medimos la fuerza de las extremidades inferiores.

c) *Dinamometría manual (DIM)*, mediante el empleo de un dinamómetro digital Takei TTK 5101 (rango 5-100 kg), realizando dos intentos alternativos con cada mano en una posición estandarizada, de pie, con los brazos paralelos al cuerpo sin contacto alguno.

d) *Suspensión con flexión de brazos (SFB)*, mediante test estandarizado de suspensión en barra fija, de forma que al flexionar los brazos el mentón se encuentre en línea con la barra. Se obtiene el máximo tiempo en esa posición hasta que el mentón queda por debajo de la barra a causa de la fatiga. Mediante c) y d) medimos la fuerza del tren superior.

e) *Carrera 4 x 10 metros*. Se trata de una carrera de ida y vuelta, en la que se han de recoger y depositar objetos a uno y otro lado del circuito, a la máxima velocidad posible. Se evalúa la velocidad, la coordinación y la agilidad<sup>40</sup>.

f) *Test de Course-Navette*. Se evalúa la resistencia cardiorrespiratoria (aerobia) a partir de un test de campo indirecto y submáximo de ida y vuelta de 20 m hasta llegar al agotamiento<sup>41</sup>.

### Composición corporal

Existen multitud de métodos que permiten la valoración de la composición corporal en adolescentes<sup>42, 43</sup>. De todos ellos el más adecuado a los estudios epide-

miológicos en amplias muestras de la población es el método antropométrico. Esa es la razón por la que en el estudio AVENA se valora la composición corporal mediante antropometría. A continuación se detalla el equipo a utilizar y la metodología para cada una de las medidas antropométricas.

### Peso

Se medirá mediante báscula modelo Seca 714 con precisión de 100 g (rango 0,1-130 kg). Cada día antes de comenzar la medición se controlará la precisión de la báscula. La medición se realizará con el individuo en ropa interior, colocado encima de la báscula, sin apoyarse en ningún sitio. Se anota la unidad completa más próxima.

### Talla

Se medirá mediante tallímetro incorporado a la báscula modelo Seca 714 (rango 60-200 cm). El individuo se colocará de pie, descalzo, con la cabeza de forma que el plano de Frankfurt, que une el borde inferior de la órbita de los ojos y el superior del meato auditivo externo, sea horizontal, con los pies juntos, rodillas estiradas, talones, nalgas y espalda en contacto con la pieza vertical del aparato medidor. Los brazos permanecen colgantes a lo largo de los costados con las palmas dirigidas hacia los muslos. La pieza horizontal y móvil del aparato se baja hasta contactar con la cabeza del individuo, presionando ligeramente el pelo. En el marcador se lee la unidad completa más cercana.

### Pliegues cutáneos

Se medirán en el hemicuerpo izquierdo mediante un lipómetro de compás modelo Holtain (rango 0-40 mm), que tiene una presión constante de 10 g/mm<sup>2</sup> de superficie de contacto. Se ha elegido el hemicuerpo izquierdo siguiendo las recomendaciones más frecuentes en población adolescente y en Europa<sup>44-47</sup>. El individuo es preguntado por el lado dominante y no dominante, teniendo en cuenta que éste puede ser diferente en los miembros superiores e inferiores.

Las mediciones se realizarán en seis localizaciones anatómicas:

e) *Tríceps*: en el punto medio entre acromion y olecranon, en la parte posterior del brazo.

f) *Bíceps*: al mismo nivel que la zona del tríceps, pero en este caso, en la cara anterior del brazo. Cuando se realicen estas mediciones el brazo debe permanecer relajado, colgando a lo largo del tronco.

g) *Subescapular*: en el punto localizado por debajo y por dentro de la escápula izquierda, con el hombro y el brazo izquierdo relajados.

h) *Suprailíaco*: es la zona superior a la cresta ilíaca, 1 cm por encima y 2 cm por dentro de la espina ilíaca antero-superior<sup>48</sup>.

i) *Muslo*: en la línea media anterior en la mitad

del muslo, con la extremidad inferior en ángulo recto, con el pie apoyado en un banco o silla.

j) *Gemelo*: en la cara interna, línea media, en la mitad de la pierna.

En los sitios mencionados, aproximadamente un centímetro por arriba o por debajo de cada uno de ellos, el pliegue cutáneo se sujeta firmemente con el dedo índice y el pulgar de la mano izquierda y se tira ligeramente hacia fuera, evitando incluir tejido muscular. La presión de la mano izquierda debe continuar mientras se realiza la medición, y la lectura se hace a los 2-3 segundos de haber colocado las superficies de contacto de las dos ramas del aparato medidor. Para aumentar la precisión de la medida se realizará tres veces empezando la segunda serie de medidas al acabar la primera, para evitar variaciones inmediatas de la composición del panículo adiposo subcutáneo tras la presión con el lipómetro<sup>49,50</sup>.

### Perímetros

Se medirán mediante una cinta métrica de material inextensible (rango 0-150 cm). Los perímetros se obtendrán en las siguientes localizaciones anatómicas:

— *Brazo*: se medirá en el brazo izquierdo. El brazo estará relajado, rodeándolo con la cinta métrica en el punto medio entre el acromion y el olecranon, sin comprimir los tejidos.

— *Bíceps contraído*: en la misma localización anatómica que el anterior, en máxima contracción del músculo bíceps y con el brazo en ángulo recto.

— *Cintura*: los individuos permanecerán en pie, con el abdomen relajado, los miembros superiores colgando junto a los costados y con los pies juntos. Se pasa una cinta métrica inextensible por una línea horizontal que se encuentre equidistante de la última costilla y la cresta ilíaca.

— *Cadera*: en la misma posición adoptada para la medida del perímetro de la cintura, se considerará perímetro de la cadera al máximo que se consigue pasando una cinta métrica de forma horizontal a nivel de la cadera.

— *Muslo*: en la misma posición, pasando una cinta métrica de forma horizontal bajo el pliegue del glúteo.

### Diámetros

Se medirán mediante pie de rey modelo Holtain (rango 0-14 cm), en las siguientes localizaciones anatómicas:

— *Muñeca*: distancia entre las superficies externas de las dos apófisis estiloides.

— *Codo*: distancia entre las superficies externas de los epicóndilos.

— *Fémur*: distancia entre las superficies externas de los dos cóndilos femorales.

### Índices antropométricos de composición corporal

Con las medidas realizadas se procederá al cálculo del somatotipo (referencias) y de diversos índices ant-

ropométricos de composición corporal. Entre ellos los más importantes serán los siguientes:

— *Índice de masa corporal (IMC)*: es la relación entre el peso en kg y la talla en metros al cuadrado. Es un índice adecuado para la valoración del sobrepeso en poblaciones<sup>51,52</sup> y para la identificación de niños y adolescentes obesos<sup>53</sup>.

— *Porcentaje de grasa corporal*: mediante la fórmula de Westrate y Deurenberg<sup>54</sup>.

— *Índices de distribución de la grasa corporal*: se valorará el perímetro de la cintura y algunas relaciones entre perímetros y pliegues cutáneos<sup>55</sup>.

### Maduración sexual

La maduración de los caracteres sexuales es un proceso típico de la adolescencia; además, numerosas características físicas y de comportamiento se ven influenciadas por la maduración sexual<sup>56</sup>. Por esta razón se valorarán también los distintos estadios de desarrollo sexual siguiendo la metodología descrita por Tanner y cols.<sup>2</sup>. Se distinguirán 5 estadios para cada una de las características: desarrollo genital y vello pubiano en varones y desarrollo mamario y vello pubiano en mujeres.

### Manipulación de las muestras de sangre

La extracción de sangre se realiza en ayunas a primera hora de la mañana y en el propio centro escolar. La extracción se realiza por personal experto y con amplia experiencia en extracciones de sangre. En la totalidad de los casos se realiza por punción en la vena cubital. A cada participante se le extraen 20 ml de sangre, que se distribuyen en 1 tubo con EDTA, 1 tubo con heparina y 1 tubo con gel para suero. Por motivos de deterioro de la muestra, el estudio hematológico (hemograma) se encarga a un laboratorio especializado en cada una de las ciudades. El hemograma se realiza en todos los casos de manera automatizada en un contador de 5 poblaciones. Las variables del estudio hematológico se detallan en la tabla III. Las demás determinaciones analíticas (estudio bioquímico-metabólico, estudio inmunológico y estudio genético) se centralizan en cada laboratorio responsable (ver apéndice). Para el envío de las muestras en tiempo óptimo se ha contratado una empresa de transporte especializada, que garantiza la entrega de muestras en el plazo previsto. Para el estudio del perfil inmunológico y genotípico, se trata de un envío urgente con plazo máximo de entrega de 6 horas desde la extracción. Dos alícuotas de suero son congeladas *in situ* a  $-20^{\circ}\text{C}$ , una para determinación sérica de parámetros inmunológicos y metabólicos y otra para obtener un banco de muestras para posibles analíticas futuras. Otras dos alícuotas de suero son enviadas refrigeradas mediante transporte especializado con llegada a destino a primera hora del día siguiente a la extracción para el estudio lipídico y metabólico. En

**Tabla III**  
*Variables del estudio hematológico*

a)	Recuento de hematíes (eritrocitos)
b)	Hemoglobina
c)	Hematocrito
d)	VCM (volumen corpuscular medio)
e)	HCM (hemoglobina corpuscular media)
f)	CHCM (concentración corpuscular media de hemoglobina)
g)	(RDW) tamaño de distribución de los eritrocitos
h)	Recuento de plaquetas
i)	(MPV) volumen plaquetar medio
j)	(PDW) tamaño de distribución de plaquetas
k)	Recuento de leucocitos (WBC)
l)	Histograma diferencial de WBC
m)	Linfocitos
n)	granulocitos %
o)	Eosinófilos %
p)	basófilos y otros elementos sanguíneos

estas condiciones las muestras son analizadas con suficiente nivel de fiabilidad.

#### *Perfil fenotípico lipídico, metabólico y hematológico*

De todas las variables analíticas posibles, se decide incluir aquellas determinaciones que están directamente relacionadas con el objetivo del estudio. Se prevé conservar alícuotas de suero para realizar determinaciones adicionales que en el desarrollo del proyecto pueda resultar de interés analizar. Los parámetros de inclusión inicial en el estudio y los métodos utilizados son los siguientes:

#### Perfil lipídico plasmático

- Triglicéridos.
- Colesterol total.
- Fosfolípidos.
- HDL-colesterol.
- LDL-colesterol.
- Apolipoproteína B.
- Apolipoproteína A1.
- Apolipoproteína (a).

#### Perfil metabólico-nutricional

- Glucosa.
- Insulina.
- Prealbúmina.
- Hierro.
- Ferritina.
- Transferrina.
- Ácido úrico.
- Calcio.
- Fósforo.

Triglicéridos, colesterol, fosfolípidos, glucosa, hierro, ácido úrico, calcio, fósforo se determinarán por

métodos enzimáticos colorimétricos usando kits comercializados por Roche-Boehringer y adaptados a un autoanalizador Hitachi 917. El HDL-colesterol se determinará tras precipitación selectiva según método descrito y validado<sup>57</sup>. El LDL-colesterol se determinará de manera indirecta o directa tras precipitación selectiva según metodología descrita<sup>58,59</sup>. Los niveles de apo B, apo A1, apolipoproteína (a) [Lp(a)], prealbúmina, ferritina y transferrina se determinan por inmunonefelometría mediante analizador de proteínas específicas Sistema Array 306 de Beckman. Los niveles de insulina se determinan mediante enzimo-inmunoanálisis usando el sistema AIA-600.

Todas las determinaciones están sometidas a controles de calidad interno y externo según la normativa aplicable a la red hospitalaria pública del Servicio Andaluz de Salud.

#### *Perfil genotípico de factores lipídicos de riesgo cardiovascular*

Actualmente, la existencia de antecedentes familiares y el nivel que se posee de LDL-colesterol/HDL-colesterol, no puede ser considerado en el niño/adolescente como un determinante inequívoco de ulterior riesgo cardiovascular. Entre otras razones, porque dicho riesgo se ve expuesto a múltiples influencias ambientales (dieta, tabaquismo, actividad física, etc., tal y como se ha expuesto). Parece pues conveniente realizar una individualización del riesgo real mediante el análisis de determinados marcadores genéticos. En este sentido, existen distintos factores genéticos que influyen en el perfil lipídico y, dentro de estos, se ha visto que es fundamental el papel de ciertas apoproteínas como la apo E y la apo (a). Estas apoproteínas, que son producto de determinados genes polimórficos, presentan diversas isoformas relativamente frecuentes en la población y pueden influir en el perfil lipídico interactuando con determinados factores exógenos.

En este estudio de forma simultánea al perfil lipídico se procederá a la determinación del genotipo de la *Apo E* a partir de DNA obtenido de muestras de sangre periférica utilizando la técnica de PCR y digestión específica con la endonucleasa de restricción *Hha I*<sup>60</sup>, y al fenotipo de la *Apo (a)* en muestras de plasma mediante electroforesis en poliácridamida al 4% seguida de transferencia electroforética a membranas de celulosa e hibridación mediante el uso de técnicas de doble anticuerpo específico marcado con peroxidasa (immunoblotting)<sup>61</sup>.

#### *Perfil inmunológico de estado nutricional*

La inclusión de los parámetros de inmunonutrición en un estudio de las características del AVENA supone una novedad. Al tratarse de técnicas muy sensibles y de elevado precio, no existe ningún estudio equivalente a nivel nacional o europeo. Al igual que en los

demás apartados, con el fin de optimizar al máximo los recursos, se realizan las siguientes determinaciones:

a) Inmunidad celular

a1) *Determinación de las subpoblaciones linfocitarias*: CD2 (linfocitos T totales), CD3 (linfocitos T maduros), CD4 (linfocitos T colaboradores), CD8 (linfocitos T citotóxicos/supresores), CD16/56 (células “natural killer”), mediante citometría de flujo, de acuerdo con Baker<sup>62</sup>.

a2) *Función inmune celular “in vitro”*. Evaluación de la citocinas procedentes de distintas células inmunocompetentes, mediante determinación de IL-1 (CD 14), IL-2 (Th1 y CD8), IL4 (Th2), IL5 (Th2), IL-10 (Th2), IL-6 (CD4 y CD14), TNF (CD14) y IFN- $\gamma$  (Th1) mediante citometría de flujo<sup>63</sup> y ELISA.

b) Inmunidad humoral

b1) *Determinación de la subpoblación linfocitaria CD19 por citometría de flujo, de acuerdo con Baker*<sup>62</sup>.

b2) *Función inmune humoral*: determinación sérica de las inmunoglobulinas G, A y M por nefelometría (Behring BN-100).

c) Inmunidad innata

c1) *Sistema de complemento*: factores de complemento C3 y C4 mediante nefelometría (Behring BN-100).

c2) *Proteínas de fase aguda*: proteína C reactiva, ceruloplasmina mediante nefelometría (Behring BN-100).

### Perfil psicológico

Esta parte del estudio se realizará aplicando en el aula dos test psicológicos validados:

a) Desórdenes del comportamiento alimentario

- EDI-2 (Inventario de Trastornos de la Conducta Alimentaria)<sup>64</sup>. La adaptación española de Corral y cols.<sup>65</sup>. El EDI es un excelente instrumento para evaluar los trastornos de la conducta alimentaria en adolescentes, ya que muestra una especial sensibilidad para valorar estos síndromes (anorexia nerviosa y bulimia nerviosa), y además resulta muy importante tanto para el diagnóstico precoz como para discriminar entre las poblaciones de riesgo, siendo por tanto una prueba muy útil como screening de esta problemática. La adaptación española data de 1998, con lo cual se dispone de baremos precisos para valorar a los sujetos experimentales.

Además, se han añadido a los cuestionarios las cinco preguntas del cuestionario SCOFF<sup>66</sup>, cuya traducción

al español se propone en la tabla IV. Estas preguntas han sido especialmente diseñadas y validadas para realizar un *screening* con el fin de detectar trastornos del comportamiento alimentario en amplios grupos de población, tal y como es el caso del proyecto AVENA.

**Tabla IV**  
*Cuestionario SCOFF para detectar trastornos del comportamiento alimentario*<sup>66</sup>.  
*Propuesta de traducción al español*

- ¿Alguna vez te sientes enfermo por haber comido demasiado y muy lleno?
- ¿Crees que has perdido el control sobre la cantidad de comida que tomas?
- ¿Has perdido más de 6 kg en los últimos tres meses?
- ¿Crees que estás demasiado gordo aunque los demás te digan que estás muy delgado?
- ¿Se podría decir que la comida domina tu vida?

b) Valoración psicológica del rendimiento escolar

- TEA (Test de Aptitudes Escolares)<sup>67</sup>. La adaptación española data de 1974, (TEA Ediciones, S.A). El test de aptitudes escolares es un excelente instrumento para la valoración global y parcial de las aptitudes básicas exigidas para el trabajo escolar (verbales, de razonamiento y de cálculo). Esto permite evaluar en los sujetos de estudio, las aptitudes y la evaluación de su potencial o grado intelectual, función clave y básica para el desempeño y rendimiento escolar.

### Control de calidad

La calidad es el primer elemento a considerar en la planificación de cualquier estudio, entendiendo como tal la garantía de los resultados y conclusiones que de él se obtengan. En un proyecto como el AVENA, estudio multicéntrico liderado en Madrid que agrupa cinco equipos investigadores, se requiere que además de las medidas de control de calidad que cada equipo tenga en relación con sus propias competencias, se necesite: analizar todo el proceso global para conocer la posible variabilidad en orden a minimizarla o eliminarla, y detectar los puntos críticos que encierra; diseñar, optimizar y unificar protocolos de actuación para controlar los puntos críticos del proceso. Esto nos ha llevado a realizar reuniones de trabajo, en las que participan los responsables de los cinco grupos, para unificar criterios y metodología además de establecer un calendario de actuación. Se elabora un manual detallado para cada una de las partes de las que consta el estudio. También se realizan o repiten talleres para lograr la capacitación necesaria de miembros de todos los equipos. Se realiza un estudio piloto en una muestra de 100 individuos para controlar la validez y corrección de todos los métodos. Posteriormente se in-

troduce, si procede, índices correctores entre los distintos equipos participantes, para poder comparar los resultados obtenidos.

La variabilidad residual que queda es la que se somete a los tratamientos estadísticos.

### *Aspectos éticos*

#### Consideraciones éticas

El estudio se lleva a cabo siguiendo las normas deontológicas reconocidas por la Declaración de Helsinki (revisión de Hong-Kong, Septiembre de 1989) y siguiendo las recomendaciones de Buena Práctica Clínica de la CEE (documento 111/3976/88 de julio de 1990) y la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos (Real Decreto 561/1993 sobre ensayos clínicos). El estudio ha sido sometido a valoración y ha obtenido la aprobación de los Comités de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y del Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla".

Antes del comienzo del estudio en cada una de las aulas, se explica detalladamente el estudio que se pretende realizar y se pide conformidad previa por escrito por parte de cada individuo y de su padre/madre o tutor/a.

#### Confidencialidad de los datos

El contenido de los cuadernos de recogida de datos, así como los documentos generados durante todo el estudio, son protegidos de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación. Por tanto, la información generada en este ensayo es considerada estrictamente confidencial, entre las partes participantes, permitiéndose, sin embargo, su inspección por las autoridades sanitarias. A título informativo se les suministra la información obtenida de manera individual a cada interesado.

### *Análisis estadístico*

Se realiza de forma centralizada mediante software SPSS y SAS. Se determinan:

- a) Parámetros de estadística básica media, moda, mediana, desviación estándar, rango (máximo y mínimo).
- b) El test de contraste de hipótesis entendido como el grado de significación de las diferencias entre medias, globales y corregidas (en función de la edad, sexo, ingesta deficiente, adecuada o excesiva en relación con cada uno de los nutrientes, gasto energético, etc.), se analizará mediante el test de la "t" de Student, test de Newman-Keuls previo análisis de la varianza. En caso de que la distribución sea no homogénea, se aplican pruebas estadísticas no paramétricas como el test de la U de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis.

El nivel de asociación entre variables se estudian mediante coeficiente de correlación de las relaciones entre datos con establecimiento de la ecuación de regresión.

### **Discusión**

Como ha constatado recientemente la Presidencia Francesa de la Unión Europea<sup>68</sup>, es preciso reconocer que no existen datos comparables y fiables de ingesta de alimentos y nutrientes en la mayor parte de los países de la UE. Esta afirmación la podemos ampliar a la mayoría de los parámetros que se van a valorar en el estudio AVENA. Por primera vez en España, se van a obtener datos representativos para poder establecer un criterio sobre la salud de los adolescentes. No debemos olvidar que el estado de salud incluye distintos factores que integran el estilo de vida, como son ingesta dietética saludable, actividad física razonable, no consumo de tabaco y moderación en el consumo de alcohol, etc.

Para conseguir los objetivos que se prevén, se hace necesario el estudio multicéntrico. La gran ventaja del AVENA es la estricta estandarización del trabajo de campo y la centralización de las analíticas y de la evaluación de cuestionarios. Esta es la única manera de excluir de entrada la enorme cantidad de variables de confusión que aparecen cuando se comparan los resultados de estudios aislados. Ello ha exigido un largo proceso de planificación, elaboración y adecuación de la metodología para que los objetivos derivados del estudio tengan absoluta fiabilidad. En aras de la viabilidad del proyecto, y atendiendo al número de sujetos a estudiar, se ha hecho necesario simplificar algunos apartados que de por sí tenía interés que hubieran sido estudiados en mayor profundidad. Tanto el estudio nutricional, como la valoración de los componentes de la condición física y de la composición corporal representan una labor costosa en términos temporales, tanto para los investigadores como para los propios sujetos experimentales evaluados. La decisión al respecto ha sido simplificar al máximo los cuestionarios y la batería de test de campo a realizar. Esto permite reducir el tiempo y posibilita realizar las pruebas en las propias instalaciones del centro. En todos los casos, al menos dos investigadores están presentes. Resulta innovador realizar la valoración del estado nutricional no solo mediante la edad cronológica de los sujetos sino también por el nivel de maduración sexual que presentan. Esta es la razón de incluir los estadios de Tanner<sup>2</sup> en el estudio AVENA.

Los principales problemas de salud relacionados con la nutrición y el estilo de vida a los que se enfrentan los adolescentes son el sobrepeso/obesidad, la anorexia nerviosa/bulimia y el inicio de diversos hábitos que condicionan la aparición de factores de riesgo en la vida adulta. Diferentes estudios han demostrado que en las últimas décadas se ha producido un alarmante incremento en la incidencia de estas patologías<sup>69</sup>. No debemos olvidar que existen los trastornos

del comportamiento alimentario no específicos, que significa que el sujeto no tiene la enfermedad propiamente dicha aunque presenta hábitos anormales con gran riesgo de padecer la enfermedad. En los trastornos de la alimentación existen claras anomalías del sistema inmune<sup>70</sup>. La caracterización de estas anomalías permite detectar situaciones subclínicas de malnutrición y conocer la evolución nutricional de estos sujetos<sup>10, 11, 71-74</sup>).

Desde nuestra orientación, se concibe el comportamiento alimentario desde una perspectiva integral, producto de la interacción de las características del sujeto (biológicas, psicológicas, culturales), y de las características de su entorno (especialmente las influencias del grupo social y de la publicidad), así como de las propias características de los alimentos. Por tanto, de esta interacción e interdependencia emergen factores de riesgo, que al confluir en un sujeto específico, pueden derivar en mal consumo de alimentos o culminar en un trastorno alimentario. Por esto, en este contexto se deben realizar las actuaciones que reviertan estos estilos, actitudes y comportamientos inadecuados, orientándolos y corrigiéndolos.

Desde la perspectiva psicológica, es imprescindible valorar los aspectos del funcionamiento psíquico de los sujetos de investigación, que están involucrados en el comportamiento alimentario y en el rendimiento académico, para obtener un diagnóstico de las actitudes, normas subjetivas y dimensiones clínicamente relevantes que conforman el sistema cognitivo/afectivo de la población diana, frente al consumo de alimentos y a los trastornos de la conducta alimentaria, para identificar factores y prácticas de riesgo en la ingesta inadecuada de nutrientes. Además, creemos interesante valorar las aptitudes cognitivas básicas involucradas en el trabajo académico que los sujetos enfrentan diariamente en sus tareas escolares, ya que estas funciones psicológicas para funcionar bien requieren de aportes nutritivos imprescindibles, especialmente cuando son exigidas en una tarea intelectual, como es el desempeño escolar.

El estudio de los marcadores genéticos en la población adolescente y su relación con distintas características fenotípicas de la población permitirá un mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos implicados en la enfermedad cardiovascular, así como el establecimiento de indicadores de riesgo, pronóstico o de respuesta terapéutica. La aplicación de estos marcadores a adolescentes en los que aún no se ha desarrollado la enfermedad, ayudará a realizar estrategias de prevención y terapéuticas encaminadas a modificar los factores ambientales o de estilo de vida que, por otra parte, son más fáciles de crear en la infancia y adolescencia. Entre estos factores destacan particularmente los hábitos dietéticos y el nivel de actividad física.

En consecuencia, resulta imprescindible la necesidad de implementar y de avalar programas de investigación e intervención en conducta alimentaria en el

ámbito escolar, sobre la base que sean sistemáticas, holísticas, participativas y rigurosas, con evidente carácter preventivo y con clara convicción de continuidad y seguimiento. Los investigadores de AVENA no quieren olvidar que la adolescencia es una etapa única en la vida. Por tanto, uniéndose a los criterios expuestos por algunos autores<sup>75, 76</sup>, consideran que la educación sanitaria de los adolescentes debe permitir al individuo comprender lo que es positivo en su persona para que de este modo pueda desarrollar todos los aspectos citados al máximo. No se deben forzar modelos de comportamiento, sino ofrecerles y fomentarles una cultura basada en estilos de vida "a realizar" en vez de estilos de vida "a evitar".

## Conclusión

En el proyecto AVENA, se ha cuidado al máximo tanto el diseño del estudio como la selección del tamaño de muestra y la metodología a emplear, de modo que todas las muestras de las cinco ciudades sean procesadas con las mismas técnicas. Con ello, se pretende obtener los datos necesarios para poder alcanzar los objetivos previstos, con el mínimo número de individuos necesarios para que los resultados sean representativos y ahorrar así tanto costes materiales, económicos como humanos. Por estos motivos, y conocida la complejidad de los proyectos multicéntricos, se ha apostado por una metodología unificada, para lo cual cada uno de los cinco grupos participantes en el estudio se hace responsable de la parte para la cual es experto. Por primera vez en España, se van a obtener datos representativos para muchas de las variables objeto de estudio, lo cual va a permitir profundizar en su conocimiento y constituye una información valiosa para tomar medidas efectivas de salud pública y promoción de la salud basados en la evidencia de los resultados obtenidos, además de ayudar a prevenir posibles enfermedades futuras.

## Referencias

1. Bueno M: Crecimiento y desarrollo humanos y sus trastornos. 2.ª ed. Ergon. Madrid, 1996.
2. Tanner JM y Whitehouse RH: Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity and stages of puberty. *Arch Dis Child*, 1976, 51:170-179.
3. FAO/WHO/UNU. Expert Consultation Report. Energy and Protein Requirements. Technical Report Series 724. WHO. Ginebra. 1985.
4. Delgado M, Gutiérrez A y Castillo MJ: Entrenamiento físico deportivo y alimentación. De la infancia a la edad adulta. 2.ª ed. Paidotribo. Barcelona, 1999.
5. Southon S, Wright AJA, Finglas PM, Bailey AH, Loughridge JM y Walker AD: Dietary intake and micronutrient status of adolescents: effect of vitamin and trace element supplementation on indices of status and performance of verbal and non-verbal intelligence. *Br J Nutr*, 1994, 71:897-987.
6. OMS: Prevención en la infancia y adolescencia de las enfermedades cardiovasculares del adulto. Serie de informes técnicos. 792. OMS. Ginebra. 1990.

7. Bercedo Sanz A, González-Lamuño D, Muñoz Cacho P y cols.: Asociación entre el perfil lipídico y genotipo de la apolipoproteína E en niños españoles (8-15 años). *An Esp Pediatr*, 1998, 49:120-124.
8. Leis R, Pavón P, Queiro T, Recarey D y Tojo R: Atherogenic diet and blood lipid profile in children and adolescents from Galicia, NW Spain. The Galinut Study. *Acta Paediatr*, 1999, 88: 19-23.
9. Csábi G, Török K, Jeges S y Molnár D: Presence of metabolic cardiovascular syndrome in obese children. *Eur J Pediatr*, 2000, 159:91-94.
10. Marcos A, Montero A, López-Varela S y Morandé G: Eating disorders (obesity, anorexia and bulimia), immunity and infection. En: Kraissid Tontisirin & Robert Susking (eds.): *Nutrition, Immunity and infection disease in infants and children*. 45<sup>th</sup> Nestle Nutrition Workshop. Bangkok, Thailand. Vevey. *Nestle Nutrition Services*, 2001, 45:243-279.
11. Castillo MJ, Scheen AJ, Jandrain B y Lefebvre PJ: Relationship between metabolic clearance rate of insulin and body mass index in a female population ranging from anorexia nervosa to severe obesity. *Int J Obesity*, 1994, 18:47-53.
12. Moreno LA, Sarriá A, Fleta J, Rodríguez G y Bueno M: Trends in obesity among children in Aragón (Spain) 1985-1995. *Int J Obes*, 1998, 22 (Suppl 4):S7.
13. Molgaard C, Thomsen BL y Michaelsen KF. Influence of weight, age and puberty on bone mineral content in healthy children and adolescents. *Acta Paediatr*, 1998, 87:494-499.
14. Frankel S, Gunnell DJ, Peters TJ, Maynard M y Davey Smith G: Childhood energy intake and adult mortality from cancer: the Boyd Orr Cohort Study. *BMJ*, 1998, 316(7130):499-504.
15. Hernández M, Castellet J, Narvaiza JL, Rincón JM, Ruiz I, Sánchez E, Sobradillo B y Zurimendi A: Curvas y tablas de crecimiento. Garsi, Madrid, 1988.
16. Moreno LA, Sarriá A, Fleta J, Rodríguez G y Bueno M: Trends in body mass index and overweight prevalence among children and adolescents in the region of Aragón (Spain) from 1985 to 1995. *Int J Obes*, 2000, 24:925-931.
17. Martín-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernández-Rodríguez JC, Salvini S y Willett WC: Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol*, 1993, 22:512-519.
18. Alcoriza J, De Cos AI, Gómez AM, Larrañaga J, Gargallo M, Sola D y Vázquez C: Propuesta de estandarización de relaciones de alimentos para la evaluación del consumo alimentario de poblaciones. *Nutr Clin*, 1990, 11:21-29.
19. Ortega S: Las 1080 recetas. Alianza Editorial. Madrid, 1998.
20. De Cos AI, Gómez C, Vázquez C y cols.: Propuesta de estandarización de raciones de alimentos y menús para la evaluación del consumo alimentario de poblaciones. *Nutr Clin*, 1991, 11:21-29.
21. Mataix J y Maffas M: Tabla de composición de alimentos españoles. Universidad de Granada. Granada, 1998.
22. Moreiras O, Calbajal A y Cabrera L: Tablas de composición de alimentos. Ediciones Piramide, S.A. Madrid, 1998.
23. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Gil-Martínez E y Rojas-Hidalgo E: Contenido de carotenoides en verduras y frutas de mayor consumo en España. INSALUD. Madrid, 1996.
24. Núñez F y Banet E: Students' conceptual patterns of human nutrition. *Int J Sci Edu*, 1997, 5:509-526.
25. American College of Sports Medicine: The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. *Med Sci Sports Exer*, 1998: 975-991.
26. Bouchard C, Shephard RJ y Stephens T (eds.): Physical activity, fitness, and health. International Proceedings and Consensus Statement. Human Kinetics. Champaign. Illinois, 1994.
27. Devis J, Peiro C, Pérez V, Ballester E, Devis FJ, Gomar MJ y Sánchez R: Actividad física, deporte y salud. Inde. Barcelona, 2000.
28. Dishman RK y Sallis JF: Determinants and interventions for physical activity and exercise. En: Bouchard C, Shephard RJ, Stephens T (eds.): *Physical activity, fitness, and health*. International Proceedings and Consensus Statement. Human Kinetics. Champaign. Illinois, 1994.
29. Sallis JF, McKenzie TL y Alcalaz FE: Habitual Physical Activity and Health-Related Physical Fitness in Fourth-Grade Children. *American Journal of Diseases in Childhood*, 1993, 147:890-896.
30. Tercedor P y Delgado M: Modalidades de practica de actividad física en el estilo de vida de los escolares. Lecturas. Educacion Física y Deportes. Revista Digital, 2000, año 5; 24. ([www.wfdeportes.com/efd24b/estilo.htm](http://www.wfdeportes.com/efd24b/estilo.htm).)
31. Tercedor P: Estudio sobre la relación entre actividad física habitual y condición física-salud en una población escolar de 10 años de edad. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 1998.
32. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC y cols.: Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sport Exer*, 2000, 32 suppl:s498-s516.
33. Ainsworth BE, Jacobs DR, León AS, Montoye HJ, Sallis JF y Paffenbarger RS: Compendium of physical activities: Classification of energy costs of human physical activities. *Med Sci Sport Exer*, 1993, 25:71-80.
34. García Ferrando M: Los españoles y el deporte, 1980-1995 (un estudio sociológico sobre comportamientos, actitudes y valores). Consejo Superior de Deportes (Madrid), Tirant lo blanch (Valencia). 1997.
35. Mendoza R, Sagrera MR y Batista JM: Conductas de los escolares españoles relacionadas con la salud (1986-1990). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, 1994.
36. Pérez Samaniego VM: El cambio de las actitudes hacia la actividad física relacionada con la salud: una investigación con estudiantes de magisterios especialistas en Educación Física. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, 1999.
37. Sánchez Bañuelos F: La actividad física orientada hacia la salud. Biblioteca nueva. Madrid, 1996.
38. MacDougall JD, Tuae D, Sale DG, Moroz JR y Sutton JR: Arterial blood pressure response to heavy resistance training. *J Appl Physiol*, 1985, 58:785-790.
39. Instituto de Ciencias de la Educación Física y el Deporte. EU-ROFIT. Test europeo de aptitud física. Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid, 1992.
40. Glosser G: Assessing sport performance in adolescents. *Eur J Physiol*, 1998: 8-14.
41. Leger LA y Lambert J: A maximal multistage 20-m shuttle run test to predict V02 max. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1982, 49:1-12.
42. Moreno LA, Rodríguez G, Sarria A y Bueno M: Evaluación de la composición corporal y del estado nutricional por antropometría y bioimpedancia eléctrica en niños y adolescentes. *Nutr Clin*, 1999, 19:3038.
43. Rodríguez G, Sarria A, Moreno LA, Fleta J y Bueno M: Nuevos métodos para la evaluación del estado nutricional del niño y adolescente. *Nutr Clin*, 2000, 20:9-20.
44. Tanner JM y Whitehouse RH: Standards for subcutaneous fat in British children. Percentiles for thickness of skinfolds over triceps and below scapula. *Br Med J*, 1962, i:446-450.
45. Tanner JM y Whitehouse RH: Revised standards for triceps and subscapular skinfolds in British children. *Arch Dis Child*, 1975; 50:142-145.
46. Gerver WJM y de Bruin R: Body composition in children based on anthropometric data. A presentation of normal values. *Eur J Pediatr*, 1996, 155:870-876.
47. Paul AA, Cole TJ, Ahmed EA y Whitehead RG: The need for

- revised standards for skinfold thickness in infancy. *Arch Dis Child*, 1998, 78:354-358.
48. Schaefer F, Georgi M, Wühl E y Schärer K: Body mass index and percentage fat mass in healthy German schoolchildren and adolescents. *Int J Obes*, 1998, 22:461-469.
  49. Weiss LW y Clark FC: Three protocols for measuring subcutaneous fat thickness on the upper extremities. *Eur J Appl Physiol*, 1987, 56:217-221.
  50. Martin AD, Ross WD, Drinkwater DT y Clarys JP: Prediction of body fat by skinfold caliper: Assumptions and cadaver evidence. *Int J Obes*, 1985, 9:31-39.
  51. Moreno LA, Sarría A, Lázaro A y Bueno M: Dietary fat intake and body mass index in Spanish children. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72 (Suppl):1399S-1403S.
  52. Sarría A, Moreno LA, García-Llop LA, Fleta J, Morellón MP y Bueno M: Body mass index, triceps skinfold and waist circumference in screening for adiposity in male children and adolescents. *Acta Paediatr*, 2001, 90:387-392.
  53. Deurenberg P, Pieters JLL y Hautvast JGAJ: The assessment of the body fat percentage by skinfold thickness measurements in childhood and young adolescence. *Br J Nutr*, 1990, 63:293-303.
  54. Moreno LA, Fleta J, Mur L, Rodríguez G, Sarría A y Bueno M: Waist circumference values in Spanish children-Gender related differences. *Eur J Clin Nutr*, 1999, 53:429-433.
  55. Moreno LA, Fleta J, Mur L, Sarría A y Bueno M: Fat distribution in obese and non obese children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1998, 27:176-180.
  56. Perks SM, Roemmich JN, Sadow-Pajewski M, Clark PA, Thomas E, Weltman A, Patrie J y Rogol AD: Alterations in growth and body composition during puberty. IV. Energy intake estimated by the Youth-Adolescent Food-Frequency Questionnaire: validation by the doubly labeled water method. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72:1455-1460.
  57. Gutiérrez A, Cano MD, Arauzo M y Castillo M: Determinación de HDL-colesterol en el laboratorio clínico: estudio comparativo entre el método directo automatizado y dos métodos indirectos. *Rev Diagn Biol*, 2000, 49:165-169.
  58. Gonzalvo MC, Rodríguez-Alemán F, Cano MD y Castillo M: Comparación de tres métodos para determinación de colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (cLDL). *Rev Diagn Biol*, 1992, 41:363-367.
  59. Cano MD, Gonzalvo C, Scheen AJ y Castillo MJ: Measurement of apolipoproteins B and A by radial immunodiffusion: methodological assessment and clinical applications. *Ann Biol Clin*, 1994, 52:657-661.
  60. Hixson JE y Vernier DT: Restriction isotyping of human apolipoprotein E by geneamplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*, 1990, 31:545-548.
  61. Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG y Seitz CJ: Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *Clin Invest*, 1987, 80:458-465.
  62. Baker JW: An innovative lymphocyte preparation system for cytometry. *Am Clin Lab*, 1988, 120:320-324.
  63. Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai T, Bishop JE y Varro R: Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem*, 1999, 45:1963-1964.
  64. Garner Beumont PJ, Garner DM y Touyz SW: Diagnoses of eating or dieting disorders: what may we learn from past mistakes? *Int J Eat Disord*, 1994, 16:349-362.
  65. Corral S, González M, Perera J y Seisdedos N: EDI-2. Inventario de trastornos de la conducta alimentaria. TEA Ediciones, S. A. Madrid, 1997.
  66. Morgan JF, Reid F y Lacey H: The SCOFF questionnaire: assessment of a new screening tool for eating disorders. *BMJ*, 1999, 319:1467-1468.
  67. Thurstone LL y Thurstone TG: Test of educational ability. Science research associates, INC. Chicago, Illinois, USA. Test de aptitudes escolares adaptado para España por la Sección de Estudio de Test de TEA Ediciones, S. A. Madrid, 1988.
  68. Societe Française de Sante Publique, Ministere de l'emploi et de la solidarite. Collection Sante et Societe, N.º 10, October 2000.
  69. Pérez-Llamas F, Garaulet M, Nieto M, Baraza JC y Zamora S: Stimates of food intake and dietary habits in a random sample of adolescents in south-east Spain. *J Hum Nutr Diet*, 1996, 9:463-471.
  70. Marcos A: Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. *Eur J Clin Nutr*, 2000, 54 (Suppl 1): S61-S64.
  71. Marcos A, Varela P, Toro O, Nova E, López-Vidriero I, Madruga D, Casas J y Morande G: Interactions between Nutrition and immunity in anorexia nervosa: a 1-y follow-up. *Am J Clin Nutr*, 1997, 66:S485-490.
  72. Attie Y y Brooks-Gunn J: Development of eating problems in adolescence girls: A longitudinal study. *Dev Psychol*, 1989, 25:70-79.
  73. Castillo M, Scheen A, Lefebvre PJ y Luyckx AS: Insulin-stimulated glucose disposal is not increased in Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 60:311-314.
  74. Scheen AJ, Castillo MJ y Lefebvre PJ: Insulin sensitivity in anorexia nervosa, a mirror image of obesity. *Diabet Metab Reviews*, 1988, 4:681-690.
  75. Joliot E y Deschamps JP: The measure of the quality of life of adolescents: a new evaluation tool of their health needs for a new educational approach? *Promot Educ*, 1997, 4:7-9.
  76. Nowak M: The weight conscious adolescent: body image, food intake, and weight-related behavior. *J Adol Health*, 1998, 23:389-398.

## Apéndice

### Coordinador proyecto AVENA:

A. Marcos, Madrid.

**Investigadores principales proyecto AVENA (por orden alfabético de la ciudad):** M. J. Castillo, Granada. A. Marcos, Madrid. S. Zamora, Murcia. M. Bueno, Zaragoza. M. García Fuentes, Santander.

### El grupo AVENA, centros colaboradores y sus investigadores asociados y actividades:

**Granada:** M. J. Castillo, M. D. Cano, R. Sola (*Estudio Metabólico y Analítico*); A. Gutiérrez, J. L. Mesa, J. Ruiz (*Condición Física*); M. Delgado, P. Tercedor, P. Chillón (*Actividad Físico-Deportiva*); M. Martín, G. Verónica, R. Castillo (*Colaboradores*). Universidad de Granada. E- 18071 Granada.

**Madrid:** A. Marcos, M. González-Gross, M. Joyanes, E. Nova, A. Montero, B de la Rosa, S. Gómez, S. Samartin, S. Medina, J. Warnberg, J. Romeo, R. Álvarez (*Coordinación, Estudio Inmunológico*); L. Barrios (*Tratamiento Estadístico*); A. Leyva (*Estudio Psicológico*). Instituto de Nutrición y Bromatología. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). E-28040 Madrid.

**Murcia:** S. Zamora, M. Garaulet, F. Pérez-Llamas,

J. C. Baraza, J. F. Marín, F. Pérez de Heredia, M. A. Fernández, C. González, R. Garcíaa, C. Torralba, E. Donat, E. Morales, M. D. Garcíaa, J. A. Martínez, J. J. Hernández, A. Asensio, F. J. Plaza, M. J. López (*Análisis Nutricional*). Dpto. Fisiología. Universidad de Murcia. E-30100 Murcia.

**Santander:** M. García Fuentes, D. González-La-

muño, P. de Rufino, R. Pérez-Prieto, D. Fernández, T. Amigo (*Estudio Genético*). Dpto. Pediatría. Universidad de Cantabria. E-19003 Santander.

**Zaragoza:** M. Bueno, L. Moreno, A. Sarriá, J. Fle-ta, G. Rodríguez, C. M. Gil, M. I. Mesana. (*Estudio Antropométrico*). Universidad de Zaragoza. E-50008 Zaragoza.

## Bibliografía

## **8. Bibliografía**

Álvarez A, Barroso A, Robledo M, et al. Prevalencia del factor V Leiden y de la mutación G20210A del gen de la protrombina en un grupo no seleccionado de pacientes con episodios trombóticos. *Sangre*. 1999;44:7–1.

Arruda V, Belangero W, Ozelo M, Oliveira G, Pagnano R, Volpon J, et al. Inherited risk factors for thrombophilia among children with Legg-Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop*. 1999;19(1):84-7.

Atsumi T, Yamano K, Muraki M, Yoshihara S, Kajihara T. The blood supply of the lateral epiphyseal arteries in Perthes' disease. *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82-B:392-8.

Balasa VV, Gruppo R, Glueck CJ, Wang P, Roy D, Wall E, et al. Legg-Calvé-Perthes disease and thrombophilia. *J Bone Joint Surg*. 2004;86-A: 2642-7.

Bahmanyar S, Montgomery SM, Weiss RJ. Maternal smoking during pregnancy, other prenatal and perinatal factors and risk of Legg-Calvé-Perthes' disease. *Pediatrics*. 2008;122:459-64. *Pediatrics*. 2008;122(2):e459-64.

Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Sirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994;369:64-7.

Bohr H. Skeletal maturation in Legg Calvé Perthes disease. Int Orthop 1979; 2:277.

Caffey J. The early roentgenographic changes in essential coxa plana; their significance in pathogenesis. Am J Roetgenol. 1968;103:620-634.

Calvé J. Sur une forme particuliere de pseudo-coxalgie greffée sur des déformations caracteristiques de léxtremité superieure du femur. Rev Chir 1910;42:54-84.

Calvé J. On a particular form of pseudo-coxalgia associated with a characteristic deformity of the upper end of the femur. 1910. Clin Orthop Relat Res. 2006;451:14-6.

Cañal J. Evolución de la trombosis venosa retiniana. Glicoproteína plaquetaria GPIIIa y otros factores de riesgo de tromboembolismo. Tesis Doctoral 2002. Director: Domingo González-Lamuño . Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria.

Carney BT, Minter CL. Nonsurgical treatment to regain hip abduction motion in Perthes disease: a retrospective review. South Med J. 2004;97(5):485-8.

Catterall A. The natural history of Perthes' disease. J Bone Joint Surg (Br). 1971;53:37-53.

Catterall A, Roberts GC, Wynne-Davies R. Association of Perthes' disease with congenital anomalies of genitourinary tract and inguinal region. *Lancet*. 1971;1:996-7.

Catterall A, Pringle J, Byers PD, Fulford GE, Kemp HB, Dolman CL, et al. A review of morphology of Perthes' disease. *J Bone Joint Surg Br*. 1982; 64:269-275.

Chung SM. The arterial supply of the developing proximal end of the human femur. *J Bone Joint Surg Am*. 1976; 58:961-970.

De Camargo FP, de Godoy RM Jr, Tovo R. Angiography in Perthes' disease. *Clin Orthop Relat Res*. 1984;(191):216-20.

De Stefano V, Leone G, Mastrangelo S, Tripodi A, Rodeghiero F, Castaman G et al. Thrombosis during pregnancy and surgery in patients with congenital deficiency of antitrombin III, protein C, protein S. *Throm Haemost* 1994; 71:799-800.

De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996 ;87:3531-44

De Stefano V, Casorelli I, Rossi E, Zappacosta B, Leone G. Interaction between hyperhomocysteinemia and inherited thrombophilic factors in venous thromboembolism. *Sem Thromb Haemost* 2000; 26:305-1

De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica*. 2002; 87:1095-108.

Derouiche F, Bôle-Feysot C, Naïmi D, Coëffier M. Hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress differentially alters proteasome composition and activities in heart and aorta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 452(3):740-5.

Eldridge J, Dilley A, Austin H, EL-Jamil M, Wolstein L, Doris J, et al. The role of protein C, protein S, and resistance to activated protein C in Legg-Perthes disease. *Pediatrics*. 2001;107(6):1329-34.

Elly LW. Legg's disease: arthritis deformans juvenil: osteochondritis deformans juveniles: "perthes" disease. *Ann Surg*. 1919;69:47-51.

Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, et al. High prevalence of hyperhomocystinemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb*. 1994;58: 1080–83.

Ferguson AB. Recent advances in understanding Legg-Perthes disease. *Orthop Survey*. 1978: 307-25.

Fisher RL. An epidemiological study of Legg- Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am*. 1972;54:769.

Franco RF, Araújo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C- > T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost.* 1998;79:119-21.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Gollete P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics.* 1995;10:111-113.

Garcia Mata S, Ardanaz Aicua E, Hidalgo Ovejero A, Martinez Grande M. Legg-Calve-Perthes disease and passive smoking. *J Pediatr Orthop* 2000;20:326-30.)

García-Ribes M, González-Lamuño D, Hernández-Estefanía R, Colman T, Pocovi M, Delgado-Rodríguez M, García-Fuentes M, Revuelta JM. Polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa gene in patients with coronary stenosis. *Thromb Haemost* 1998; 79(6): 1126-1129.

Gallistl S, Reitinger T, Linhart W, Muntean W. The role of inherited thrombotic disorders in the etiology of Legg-Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop.* 1999;19(1):82-3.

Glueck CJ, Glueck HI, Greenfield D, Freiberg R, Kahn A, Hamer T, et al. Protein C and S deficiency thrombophilia and hypofibrinolysis: pathophysiologic causes of Legg-Perthes disease. *Pediatr Res.* 1994;35: 383-8.

Glueck CJ, Crawford A, Roy D, Freiberg R, Glueck H, Stroop D. Association of antithrombotic factor deficiencies and hypofibrinolysis with Legg-Perthes disease. *J Bone Joint Surg.* 1996;78-A:3-13.

Glueck CJ, Brandt G, Gruppo R, Crawford A, Roy D, Tracy T, Stroop D, et al. Resistance to activated protein C and Legg-Perthes disease. *Clin Orthop.* 1997;338:139-52.

González Porras JR, Pérez López E, Alberca I, Lozano FS. Influencia de la mutación C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa en la enfermedad tromboembólica venosa. *Angiología.* 2010;62(6):225-31.

Gordon J.E., Schoenecker P.L., Osland J.D., Dobbs M.B., Szymanski D.A., and Luhmann S.J.: Smoking and socio-economic status in the aetiology and severity of Legg-Calve-Perthes' disease. *J. Pediatr. Orthop. B* 2004;13: 367-70.

Green NE, Griffin PP. Intra-osseous venous pressure in Legg-Perthes disease. *Bone Joint Surg Am.* 1982;64:666-71.

Grzegorzewsky A, Synder M, Kozlowski P, Symczak W, Bowen RJ. The role of the acetabulum in Perthes disease. *J Pediatr Orthop.* 2006; 26:316-21.

Hall AJ, Margetts BM, Barker DJP, et al. Low blood manganese levels in Liverpool children with Perthes' disease. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1989;3:131-5.

Harper PS, Brotherton BJ, Cochlin D. Genetic risks in Perthes' disease. Clin Genet. 1976;10:178-82.

Herring JA, Neustadt JB, Williams JJ, et al: The lateral pillar classification of Legg-Calvé-Perthes disease, J Pediatr Orthop 12:143, 1992.

Herring HA, Kim HT, Browne R: Legg-Calvé-Perthes disease. Part II. Prospective multicenter study of the effect of treatment on outcome, J Bone Joint Surg Am. 2004;86:2121-34.

Hessner MJ, Dinauer DM, Kwiatkowski R, Neri B, Raife TJ. Age-dependent prevalence of vascular disease-associated polymorphisms among 2689 volunteer blood donors. Clinical Chemistry 2001;47:1879-1884.

Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. En: Erlich HA editor. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press; 1989: p. 31-7.

Hofstaetter JG, Roschger P, Klaushofer K, Kim HK. Increased matrix mineralization in the immature femoral head following ischemic osteonecrosis. Bone. 2010;46(2):379-85.

Hresko T, McDougall P, Gorlin J, Vamvakas E, Kasser J, Neufeld E. Prospective reevaluation of the association between thrombotic diathesis and Legg-Perthes disease. J Bone Joint Surg. 2002;84-A:1613-18.

Inoue A, Freeman MA, Vernon-Roberts B, Mizuno S. The pathogenesis of Perthes´disease. Bone Joint Surg Br. 1976;58:453-61.

Ippolito D, Tudisco C, Farsetti P. The long-term prognosis of the unilateral Perthes´ disease. J Bone Joint Surg. 1987; 69-B:243-250.

Joseph B, Chacko V, Rao BS, et al. The epidemiology of Perthes´disease in south India. Int J Epidemiol 1988; 17(3):603-7.

Joseph B, Mulpuri K, Varghese G. Perthes´disease in the adolescents. J Bone Joint Surg Br.2001; 83:715-20.

Joseph B, Nair NS, Narashima Rao KL, Mulpuri K, Varghese G. Optimal timing for containment surgery for Perthes disease. J Pediatr Orthop. 2003; 23: 601-6.

Joseph B, Price C, Principles of containment treatment aimed at preventing femoral head deformation in Perthes disease. Orthop Clin N Am. 2011;42:317-327.

Junker R, Koch HG, Auberger K, et al. Prothrombin G20210A gene mutation and further prothrombotic risk factors in childhood thrombophilia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:2568–2572.

Kim H. Legg-Calvé\_Perthes disease. J Am Acad Orthop Surg. 2010;18:678-686.

Kim H, Herring JA. Pathophysiology, classification, and natural history of Perthes disease. *Orthop Clin N Am.* 2011; 42:285-95.

Kim H. Pathophysiology and new strategies for the treatment of Legg-Calvé-Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am.* 2012; 94(7):659-669.

Kim H, Herring JA. Legg-Calve-Perthes disease. En: Herring J. Tachdjian´s. *Pediatric Orthopaedics.* 5<sup>th</sup> Edition. Texas: Elsevier; 2014.580-629.

Kealey WD, Moore AJ, Cook S, Cosgrove AP. Deprivation, urbanization and Perthes' disease in Northern Ireland. *J Bone Joint Surg [Br]* 2000;82-B:167-71.

Kealey W, Mayne E, McDonald W et al. The role of coagulation anomalies in the development of Perthes'disease. *J Bone Joint Surg* 2000 ; 82-B : 744-746

Kenet G, Ezra E, Wientroub S, Steinberg DM, Rosenberg N, Waldman D, et al. Perthes' disease and reach for genetic associations:Collagen mutations, Gaucher's disease and thrombophilia. *J Bone Joint Surg Br.* 2008;90(11):1507-11.

Kluijtmans LA, Van Den Heuvel LP, Boers GH, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocystinemia: a common mutation in the methylentetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet.* 1996;58:35–41.

Landin LA, Danielsson LG, Wattsgard C. Transient synovitis of the hip. Its incidence, epidemiology and relation to Perthes' disease. *J Bone Joint Surg Br.* 1987;69:238-242.

Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med.* 1995;332(23):1553-9.

Legg AT: An obscure affection of the hip. *Boston Med and Surg* 1910; 162:202-4.

Legg AT. An obscure affection of the hip.1910. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 451:11-3.

Little D, Kim HKW. Future biologic treatments for Perthes disease. *Orthop Clin North Am.* 2011;42(3):423-7.

Liu SL, Ho TC. The role of venous hypertension in the pathogenesis of Legg-Perthes disease. A clinical and experimental study. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73(2):194-200.

Lim M.Y., Deal A.M., Kim S., Musty M.D., Conard J., Simioni P., Dutrillaux F., Eid S.S., Middeldorp S., Halbmayer W.M., et al. Thrombophilic risk of individuals with rare compound factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms: An international case series of 100 individuals. *Eur. J. Haematol.* 2016;97:353–360

Llamas Sillero P, Fernández de Velasco J, Loscertales J, et al. ProC Global: an automated screening test for factor V Leiden and prothrombin mutation 20210 G to A detection. *Thromb Res.* 2001;101:215–16.

Loder RT, Schwartz EM, Hensinger RN. Behavioral characteristics of children with Legg- Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop.* 1993;13(5):598-601.

López-Franco M, González-Morán G, De Lucas JC, Llamas P, de Velaco JF, Vivancos JC, Epeldegui-Torre T. Legg-Perthes disease and heritable thrombophilia. *J. Pediatr Orthop.* 2005;25:456-9.

Makin M, Meyer S, Gilai AN. Perthes' disease and posterior lumbosacral union. *J Pediatr Orthop.* 1992;12:607—9.

Malagón V. *Revista colombiana de Ortopedia y traumatología.* Vol 10 nº3. Octubre 1999.

Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol* 2000; 111:1223-9.

Mata SG, Aicua EA, Ovejero AH, Grande MM. Legg-Calvé-Perthes disease and passive smoking. *J Pediatr Orthop.* 2000;20(3):326-30.

Margretts BM, Perry CA, Taylor JF, Dangerfield PH. The incidence and distribution of Legg-Calve-Perthes' disease in Liverpool, 1982-95. Arch Dis Child 2001;84:351-4.

Molloy MK, MacMahon B. Incidence of Legg-Perthes disease (osteochondritis deformans). N Engl J Med 1966;275:988-90.

Mose K: Methods of measuring in Legg-Calvé-Perthes disease with special regard to the prognosis, Clin Orthop Relat Res 150:103, 1980.

Neyt JG, Weinstein SL, Spratt KF, Dolan L, Morcuende J, Dietz FR, et al. Stulberg classification system for evaluation of Legg-Calve-Perthes disease: intra- rater and inter-rater reliability. J Bone Joint Surg Am. 1999;81(9):1209-16.

Nowak Gottl U, Koch HG, Aschkal B. Resistance to activated protein C in children with venous or arterial thromboembolism. Br Journal of Haematology 1996; 92:992–997.

Perry DC, Hall AJ. The epidemiology and etiology of Perthes disease. Orthop Clin N Am. 2011;42:279-83.

Perthes G: Uber Osteochondritis deformans juveniles. Deutsche Zeitschr Chir 1910,107: 111-159.

Perthes G. The classic: On juvenile arthritis deformans. 1910. Clin Orthop Relat Res. 2012 Sep; 470; 2349-68.

Pillai A, Aliya S, Costigan PS. The incidence of Perthes' disease in southwest Scotland. J Bone Joint Surg [Br] 2005;87-B:1531-5.

Ponseti IV, Maynard JA, Weinstein SL, Ippolito EG, Pons JG. Legg-Calvé-Perthes disease: histochemical and ultrastructural observations of the epiphyseal cartilage and physis. J Bone Joint Surg Am. 1983; 65:797-807.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood. 1996;88(10):3698-703.

Price CT, Thompson GH, Wenger DR. Containment methods for treatment of Legg-Calvé-Perthes disease. Orthop Clin N Am. 2011;42:329-340.

Rowe S-M, Jung S-T, Lee K-B, et al. The incidence of Perthes' disease in Korea: a focus on differences among races. J Bone Joint Surg [Br] 2005;87-B:1666-8.

Salter RB, Thompson GH. Legg-Calvé-Perthes disease. The prognostic significance of subcondral fracture and two-group classification of the femoral head involvement. J Bone Joint Surg Am. 1984;64(4):479-89.

Sanchis M, Freeman MAR, Zahir A. Experimental stimulation of the blood supply to the capital epiphysis in the puppy. *J Bone Joint Surg Am.* 1973;55(2):335-42.

Schafer AI. Trastornos trombóticos: estados de hipercoagulabilidad. En: Goldman L. Cecil y Goldman. *Tratado de medicina interna.* 24ª Edición. New York: Elsevier; 2013. 1152-58.

Schobbes R, Junker R, Auberger K, et al. Factor V G1691A and prothrombin G20210A in childhood spontaneous venous thrombosis: evidence of an age-dependent thrombotic onset in carriers of factor V G1691A and prothrombin G20210A mutation. *Eur J Pediatr.* 1999; 158(suppl 3):105–108.

Seligsohn U. A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001;344(16):1222-31.

Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbinati P, Gavasso S, Cefalo P, et al. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. *Blood* 2002; 99: 1938-42.

Sirvent N, Fisher F, el Hayek T, Appert A, Giudicelli H, Griffet J. Absence of congenital prethrombotic disorders in children with Legg-Perthes disease. *J Pediatr Orthop B.* 2000;9(1):24-7.

Soria JM. El componente genético de las alteraciones de la coagulación y de la trombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2009;9:58B-65B.

Stulberg SD, Cooperman DR, Wallensten R. The natural history of Legg-Calve-Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am.* 1981;63(7):1095-108.

Suehiro M, Hirano T, Mihara K, Shindo H. Etiologic factors in femoral head osteonecrosis in growing rats. *J Orthop Sci.*2000; 5(1):52-6.

Szepesi K, Pószán E, Hársfalvi J, Ajzner É, Szücs G, Gáspár L, Csernátóy Z, Udvardy M. The most severe forms of Perthes' disease associated with the homozygous Factor V Leiden mutation . *J Bone Joint Surg* 2004; 86-B: 426-429.

Tachdjian's. *Pediatric Orthopaedics. Legg-Calvé-Perthes disease.* Fifth edition. Herring, John A., MD. 2014, by Saunders, an imprint of Elsevier Inc. p 580-629.

Terjessen T, Wiig O, Svenningsen S. The natural history of Perthes' disease. *Acta Orthop.* 2010; 81 (6):708-14.

Theron J. Angiography in Legg-Calvé-Perthes disease. *Radiology.* 1980;131(1):81-92.

Thomas DP, Morgan G, Tayton K. Perthes' disease and the relevance of thrombophilia . *J Bone Joint Surg.* 1999;81(4): 691-5.

Trueta J. *Studies of the development and decay of the human frame.* Philadelphia.W.B. Saunders.1968.

Van Dam BE, Cridcr RJ, Noycs JD, Larwn U. Determination of the Catterall classification in Legg-Calvé-Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am* 1981;63:906-914.

Vosmaer A, Pereira RR, Koenderman JS, Rosendaal FR, Cannegieter SC, et al. Coagulation abnormalities in Legg-Calvé- Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(1):121-8.

Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Br Med J*. 2002;325: 1202–1206.

Waldenström H: The definite form of coxa plana. *Acta Radiol* 1922;1:384.

Weinstein SL. Legg-Calvé-Perthes syndrome. En: Morrissy RT, Weinstein SL (eds). *Pediatric Orthopaedics*, ed 6. Philadelphia, PA, Lippincott Raven, 2006, vol 2; 1039-1083.

Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med*. 1996;334(17):1090-4.

Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1042-50.

Wierzbicki. Diabetes and vascular disease research. 2007; 4(2):143-9.

Wiig O, Terjense T, Svenningsen S, Lie SA. The epidemiology and aetiology of Perthes disease in Norway. *J Bone Joint Surg Br.*2006;88:1217-1223.

Wiig O, Terjesen T. Sveimingsen S. Prognostic factors and outcome of treatment in Perthes disease: a prospective study of 368 patients with five-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br.* 2008;90(10):1364-71

Wingstrand H, Bauer GC, Brismar J, Carlin NO, Pettersson H, Sundén G, et al. Transient ischaemia of the proximal femoral epiphysis in the children: interpretation of bone scintimetry for diagnosis in hip pain. *Acta Orthop Scand.* 1985;56(3):197-203.

Woratanarat P, Thaveeratitharm C, Woratanarat T, Angsanuntsukh C, Attia J, Ammarin T. Meta-Analysis of Hypercoagulability Genetic Polymorphisms in Perthes Disease. *J Orthop Research.*2014; 32: 1-7.

Xu W, Wang TY, Becker RC. Enfermedades hematológicas desde dentro del corazón. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64(7):606-613.

Producción Científica

## Article

# PLA2 Polymorphism of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa and C677T Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*), but Not Factor V Leiden and Prothrombin G20210A Polymorphisms, Are Associated with More Severe Forms of Legg–Calvé–Perthes Disease

María Dolores García-Alfaro<sup>1</sup>, María Isabel Pérez-Nuñez<sup>1</sup>, María Teresa Amigo<sup>2</sup>, Carmelo Arbona<sup>1</sup>,  
María Ángeles Ballesteros<sup>3</sup>  and Domingo González-Lamuño<sup>2,4,\*</sup> 



**Citation:** García-Alfaro, M.D.; Pérez-Nuñez, M.I.; Amigo, M.T.; Arbona, C.; Ballesteros, M.Á.; González-Lamuño, D. PLA2 Polymorphism of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa and C677T Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*), but Not Factor V Leiden and Prothrombin G20210A Polymorphisms, Are Associated with More Severe Forms of Legg–Calvé–Perthes Disease. *Children* **2021**, *8*, 614. <https://doi.org/10.3390/children8070614>

Academic Editor:  
Riccardo D'Ambrosi

Received: 18 June 2021  
Accepted: 17 July 2021  
Published: 20 July 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Department of Orthopaedic Surgery, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Avda Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain; dolores.garcia@scsalud.es (M.D.G.-A.); perezmi@unican.es (M.I.P.-N.); carmelo.arbona@scsalud.es (C.A.)
  - <sup>2</sup> Laboratorio de Pediatría, Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Cantabria, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain; teresa.amigo@unican.es
  - <sup>3</sup> Department of Critical Care Medicine, Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Avda Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain; mdelosangeles.ballesteros@scsalud.es
  - <sup>4</sup> Division of Pediatrics, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Avda Valdecilla s/n 39008 Santander, Spain
- \* Correspondence: gonzaleld@unican.es; Tel.: +34-942-202-604

**Abstract:** The possible association of common polymorphic variants related to thrombophilia (the rs6025(A) allele encoding the Leiden mutation, rs1799963(A), i.e., the G20210A mutation of the prothrombin *F2* gene, the rs1801133(T) variant of the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene that encodes an enzyme involved in folate metabolism, and rs5918(C), i.e., the 'A2' allele of the platelet-specific alloantigen system that increases platelet aggregation induced by agonists), with the risk of Legg–Calvé–Perthes disease (LCPD) and the degree of hip involvement (Catterall stages I to IV) was analyzed in a cohort study, including 41 children of ages 2 to 10.9 (mean 5.4, SD 2.2), on the basis of clinical and radiological criteria of LCPD. In 10 of the cases, hip involvement was bilateral; thus, a total of 51 hips were followed-up for a mean of 75.5 months. The distribution of genotypes among patients and 118 controls showed no significant differences, with a slightly increased risk for LCPD in rs6025(A) carriers (OR: 2.9, CI: 0.2–47.8). Regarding the severity of LCPD based on Catterall classification, the rs1801133(T) variant of the *MTHFR* gene and the rs5918(C) variant of the platelet glycoprotein IIb/IIIa were associated with more severe forms of Perthes disease (Catterall III–IV) ( $p < 0.05$ ). The four children homozygous for mutated *MTHFR* had a severe form of the disease (Stage IV of Catterall) and a higher risk of non-favorable outcome (Stulberg IV–V).

**Keywords:** Legg–Calvé–Perthes disease; gene polymorphism; heritable thrombophilia

## 1. Introduction

Legg–Calvé–Perthes disease (LCPD), characterized by avascular necrosis of the proximal femoral epiphysis [1–4], remains a controversial entity in child orthopedics. During rapid growth, the interruption of adequate blood supply to the secondary ossification centers in the epiphyses makes these areas prone to avascular necrosis, resulting in necrosis, removal of the necrotic tissue, and its replacement with new bone [5,6]. Hereditary thrombophilia has gained considerable attention as a risk factor for LCPD, although there are still controversies about this association or its potential implication in the severity of the disease [7,8]. Familial osteonecrosis of the femoral head has been associated with variant mutations of collagen type II [9,10]; however, the extracellular matrix might have a

role in the pathogenesis or outcomes of LCPD. The thrombophilic factors include platelet transmembrane receptors that facilitate cell adhesion within extracellular matrix ligands; therefore, we aimed to investigate the possible correlation between the severity of LCPD and the presence of prevalent and well-known thrombophilic polymorphisms implied in extracellular matrix and tissue remodeling.

Our LCPD cohort and a group of controls were characterized for: (1) the PIA2 variant (rs5918(C)) of the platelet membrane glycoprotein (GP) IIb/IIIa, a central molecule in platelet adhesion and aggregation by the high-affinity binding of fibrinogen; (2) the rs1801133(T) variant in the *MTHFR* gene, playing a role involving tissue homocysteine in endothelial cell injury and adverse extracellular matrix remodeling; (3) the rs6025(A) variant encoding the Leiden mutation; (4) the rs1799963(A) variant of the prothrombin *F2* gene; the last two variants are associated with a prothrombotic genetic status. LCPD severity at the time of diagnosis is defined by Catterall classification based on the radiographic appearance of the epiphysis and metaphysis visible in osteonecrosis of the femoral head [11,12].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

A cohort study was conducted, including 41 children diagnosed with LCPD disease in the Child Orthopedics Unit of the University Hospital Marqués de Valdecilla between January 1996 and December 2014. All patients presented clinical and radiological characteristics of LCPD. In 10 of them, the involvement was bilateral, representing a total of 51 hips.

Informed consent was obtained from all the individual participants (from their parents or guardians) according to the criteria of the Declaration of Helsinki, a statement of ethical principles for medical research involving human subjects, including research on identifiable human material and data. The study was supervised and approved by the Ethical Committee of the authors' University and University Hospital (CEIC-C: Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria). After obtaining informed consent from the parents of all patients, a blood sample was drawn for DNA analysis. None of the patients had any clinical or familial evidence of significant vascular diseases, such as severe atherosclerosis, arterial thrombosis, coronary disease, hypertension, renal diseases, ischemic heart diseases, cerebrovascular diseases or coexisting disorders that could be associated with the polymorphisms analyzed. The presence of other causes of osteonecrosis of the hip was a reason for exclusion, such as by the use of steroids, hypothyroidism, epiphyseal dysplasia, metabolic bone disease, sickle cell disease, lupus, hip fracture, or septic arthritis. Demographic variables were collected as well as the evolution of the disease.

### 2.2. Controls

A control group of 118 healthy children and adolescents with no previous history of thromboembolism and representative of the general population of our region was assembled. Blood samples were obtained from them after informed consent for the AVENA study (study of cardiovascular risk related to nutritional and lifestyle habits, financed by a grant from the Spanish government, 2002–2005, and approved by the Ethical Committee of the University Hospital (CEIC-C: Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria)).

### 2.3. Genetic Analysis

DNA extraction. A sample of 2 mL of peripheral blood in EDTA was obtained from all participants; DNA extraction and purification were performed using the modified method of Higuchi [13] and the samples were frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Subsequently, all genetic polymorphisms were studied by polymerase chain reaction (PCR) amplification and analysis of the restriction fragments (RFLP) after digestion with the corresponding restriction enzyme, by the protocols described below.

Characterization of PIA2 polymorphism of the platelet membrane glycoprotein (GP) IIb/IIIa (rs5918(C)), using a modified protocol described by Weiss et al. [14]. PCR amplification of DNA fragments was performed with the following primers: 5' TTC TGA TTG CTG GAC TTC TCT T 3' and 5' TCT CTC CCC ATG GCA AAG AGT 3'. The amplified fragments were digested within Msp I (Invitrogen, USA) and separated in 3% agarose MS-12 (Laboratorios Conda, Madrid, Spain). PIA1 alleles exhibited two fragments of 221 and 46 bp; PIA2 (mutated) alleles exhibited three fragments of 177, 46, and 44 bp.

Characterization of C677T methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphism (rs1801133(T)). DNA fragments were amplified by PCR following the protocol described by Frosst et al. [15], using the primers 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' and 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'. The PCR fragments were digested within the restriction enzyme Hinf I (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). After electrophoresis in agarose 3%, a single 198 bp fragment corresponded to the C allele, and 175 and 23 bp fragments corresponded to the T allele (mutated allele).

Characterization of factor V Leiden mutation in the *F5* gene associated with factor V Leiden thrombophilia (rs6025(A)) was conducted using a modified protocol described by Bertina et al. [16]. PCR amplification of DNA fragments was performed with the primers 5' TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC A 3' and 5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA 3'. The amplified fragments were digested within Mml I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and separated in 3% agarose MS-12 (Laboratorios Conda, Madrid, Spain). The normal alleles exhibited three fragments of 163, 67, and 37 bp, and the mutated alleles (Leiden mutation) exhibited two fragments of 200 and 67 bp.

Characterization of the prothrombin thrombophilia associated with G20210A polymorphism in the *F2* gene (rs1799963(A)) was conducted by using a modified protocol described by Poort et al. [17]. The following primers were used for the PCR amplification of DNA fragments: 5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3' and 5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG AA\*G C-3'; subsequently, the amplified fragments were digested within Hind III (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) and separated in 3% agarose MS-12 (Laboratorios Conda, Madrid, Spain). The normal alleles exhibited three fragments of 345 bp, and the mutated alleles (Leiden mutation) exhibited two fragments of 322 and 23 bp.

#### 2.4. Risk Haplotypes

Different genetic risk-haplotypes categories were defined by the combination of pairs of genotypes. Haplotypes related to thrombophilia but also affecting extracellular matrix remodeling were indicated by the combination of GP IIb/III and *MTHFR* genotypes, whereas haplotypes related just to a prothrombotic status were defined by the combination of genotypes for factor V Leiden and prothrombin.

High-risk thrombophilia and potential adverse extracellular matrix remodeling were considered in haplotypes homozygous for the PIA2 variant of GP IIb/III (PIA2/PIA2) or homozygous for the T allele at *MTHFR* C677T (TT). Low-risk haplotypes were associated with the absence of the PIA2 variant (PIA1/PIA1) combined with non-mutated homozygous haplotypes or with heterozygosity for C677T (C/C and C/T); intermediate-risk phenotypes were identified by the presence of one allele (heterozygous) for PIA2 combined with heterozygous or non-mutated haplotypes for C667 (C/T and C/C).

The only genetic haplotypes associated with a substantial risk of thrombosis were defined as follows: haplotypes with a homozygous mutation for both factor V Leiden and prothrombin G20210 (high risk); haplotypes with a homozygous mutation for factor V Leiden plus heterozygous (G/A) for prothrombin G20210A (intermediate risk); haplotypes with non-mutated homozygous AA for G20210A plus heterozygous for factor V Leiden (low risk) [18].

### 2.5. Catterall Stages Classification of Severity

Markers of severity and prognosis of the LCPD are established by Catterall classification, which is based on the radiographic appearance of the epiphysis and metaphysis of the femoral head. Stage I: bone absorption changes visible in the anterior aspect of the epiphysis of the femoral head, changes are visible best in frog leg lateral view, no sclerosis is seen; Stage II: further bone resorption with slight femoral head collapse in the anterior aspect of femoral head, sclerosis; Stage III: almost entire femoral head involved in collapse with characteristic head-within-head appearance, sclerosis; Stage IV: complete collapse of the femoral head with the flattening and formation of dense sclerosis; additional metaphyseal changes may be visible, sclerosis, posterior remodeling [11,12,19].

### 2.6. Statistical Analysis

Quantitative variables were expressed as the mean and standard deviation, and categorical variables as absolute values and percentages (%). Each polymorphism was statistically described, estimating the prevalence of each allele and each possible genotype (allele and genotype frequencies) or were defined under risk haplotypes or a combination of genotypes. The frequencies of each allele and possible genotype or haplotype were calculated with their 95% confidence intervals (CIs). Pearson's chi-squared or Fisher's exact test was used for the comparison of categorical variables. Student's *t*-test or Mann-Whitney U test was used for the comparison of quantitative variables. The frequency of the genotypes for each polymorphism was compared between the different groups using the Hardy-Weinberg equilibrium with the Pearson's chi-squared test. The odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) were calculated to estimate the relationship of polymorphisms with disease severity in patients vs. controls using non-conditional binary logistic regression models. All the tests were bilateral, and differences were considered significant when  $p < 0.05$ . All statistical analyses were performed using SPSS software version 15 for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## 3. Results

A total of 36 of 41 patients (88%) with LCPD were boys, and 5 patients (12%) were girls. At diagnosis, the mean age was 5.42 years (SD 2.17), with a minimum age of 2.04 years and a maximum age of 10.85 years. The mean length of follow-up was 75.5 months (SD 45.3).

No patient had a personal history of previous thrombotic events or evidence of thrombotic disease in their first-degree relatives. During the course of the disease, both hips were affected in 10 patients (24%), 90% of which were male (9 males and 1 female). For some analyses, a total of 51 hips with LCPD were considered.

Considering the grades of severity based on Catterall classification, at the time of diagnosis, 3 hips (6%) were grade I on the Catterall scale, 7 hips were grade II (14%), 21 hips were grade III (41%), and 20 hips were grade IV (39%). This implies that, at diagnosis, 41 hips (80%) were in a severe phase of the disease (Catterall grades III and IV).

The genotype and allelic frequency distributions in both patients and controls were as summarized in Table 1:

**Table 1.** Genotype and allele distribution among LCPD hips and controls.

	Genotypes/Alleles	Controls	LCPD	OR (CI95%)	<i>p</i>
Factor V	GG	117 (99.2%)	49 (96.1%)	1	0.206
	GA	1 (0.8%)	2 (3.9%)	4.8 (0.4 to 53.9)	
	AA	0	0		
Allele frequencies	G	235 (99%)	100 (98%)	4.7 (0.4 to 52.4)	0.452
	A	1 (1%)	2 (2%)		

Table 1. Cont.

	Genotypes/Alleles	Controls	LCPD	OR (CI95%)	<i>p</i>
<i>MTHFR</i>	CC	47 (39.8%)	26 (51%)	1	0.181
	CT	57 (48.3%)	20 (39.2%)	0.6 (0.3 to 1.2)	
	TT	14 (11.9%)	5 (9.8%)		
Allele frequencies	C	151 (63.9%)	72 (70.6%)		0.290
	T	85 (36.1%)	30 (29.4%)	0.7 (0.4 to 1.2)	
GP IIb/IIIa	A1A1	87 (73.7%)	34 (66.7%)	1	0.351
	A1A2	28 (23.7%)	16 (31.4%)	1.4 (0.7 to 2.9)	
	A2A2	3 (2.5%)	1 (1.9%)		
Allele frequencies	A1	202 (85.6%)	84 (82.4%)		0.552
	A2	34 (14.4%)	18 (17.6%)	1.4 (0.7 to 2.4)	
Prothrombin	GG	114 (96.6%)	51 (100%)	1	0.999
	GA	4 (3.4%)	0 (0%)	0.000	
	AA	0 (0%)	0 (0%)		
Allele frequencies	G	232 (98.3%)	102 (100%)		0.438
	A	4 (1.7%)	0	0.3 (0.01 to 4.7)	

Abbreviations: GP IIb/IIIa: platelet glycoprotein IIb/IIIa; LCPD: Legg–Calvé–Perthes disease; *MTHFR*: methylenetetrahydrofolate reductase; OR: odds ratio; *p*: *p*-value.

- *PLA2* polymorphism of the platelet membrane glycoprotein (GP) IIb/IIIa (rs5918(C)). Similar distributions in both LCPD cases and controls were observed for alleles and genotypes; thus, no significant risk for LCPD can be attributed to the presence of this polymorphism. The prevalence of mutated alleles was 17.1% (95% confidence intervals 10.5 to 26.6) in LCPD patients and 14.4% (95% confidence intervals, 10.5 to 19.5) in controls. The odds ratio of the A2 allele versus the A1 allele was 1.22 (95% confidence intervals 0.6 to 2.4; *p* = 0.561). The odds ratio for LCPD in those who were homozygous or heterozygous for the mutated allele relative to subjects with a normal genotype was 1.3 (95% confidence intervals 0.6 to 2.8).
- Mutation C677T of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), (rs1801133(T)). No significant differences in allele frequencies were detected between cases of LCPD and controls. The prevalence of mutated alleles was 32.9% (95% confidence intervals 23.7 to 43.6) in the group of LCPD hips and 36% (confidence intervals 95% 30.2 to 42.3) in the controls, with the odds ratio of T versus C being 0.9 (95% confidence intervals 0.4 to 1.4).
- Factor V Leiden mutation in the *F5* gene causing factor V Leiden thrombophilia (rs6025(A)). Most cases (97%) and controls (99%) had a normal genotype for G1691A mutation in the *F5* gene. No cases of mutated homozygous haplotypes were identified, either in cases or in controls. However, a positive trend was observed between LCPD and the presence of factor V Leiden mutation, with the odds ratio of A versus G being 2.9 (95% confidence intervals of 0.2 to 46.9).
- G20210A mutation of the prothrombin *F2* gene (rs1799963(A)). All patients with LCPD and most of the controls (97%) were G/G homozygous for the G20210A mutation of prothrombin *F2* gene, and only four of the controls were heterozygous (G/A) for the polymorphism. No homozygous AA cases were detected. The prevalence of mutated A alleles was 1.7% (95% confidence intervals 0.6 to 4.3) in the controls, whereas no mutated A alleles were detected in the cases, with an odds ratio of 0.3 (95% confidence intervals 0.01 to 5.7) for allele A with respect to the G allele.

### Genetic Haplotypes

The frequencies of the different haplotypes (low-, intermediate- and high-risk haplotypes) and the number of hips affected by LCPD are shown in Table 2.

**Table 2.** Haplotype distributions among the LCPD hips analyzed.

Number of Evaluated LCPD Hips = 51					
Low Risk *		Intermediate Risk *		High Risk *	
<i>n</i> = 31		<i>n</i> = 14		<i>n</i> = 6	
A1A1–CC	15 (48.4%)	A1A2–CT	3 (21.4%)	A2A2–TT	0
A1A1–CT	16 (51.6%)	A1A2–CC	11 (78.6%)	A1A2–TT	2 (33.3%)
				A1A1–TT	3 (50%)
				A2A2–CT	1 (16.7%)
				A2A2–CC	0

\* Low-risk haplotypes: a combination of normal homozygous status for the *PLA2* (A1A1) polymorphism with homozygous normal (CC) and heterozygous (CT) status for the C677T mutation of the *MTHFR* gene. Intermediate-risk haplotypes: those heterozygous for the *PLA2* (A1A2) polymorphism plus normal homozygous (CC) or heterozygous (CT) haplotypes for the C677T mutation of the *MTHFR* gene. High-risk haplotypes: a combination of the homozygous status for *MTHFR* (TT) or *PLA2* (A2A2) genes.

As described in the Methods section, haplotypes were defined by the combination of the different GP IIB/III and *MTHFR* genotypes. In total, 12% of the hips (*n* = 6) corresponded to patients with high-risk thrombophilia plus potential adverse extracellular matrix remodeling; 27% of the hips (*n* = 14) corresponded to patients with intermediate risk, and 61% (*n* = 31) corresponded to patients with low risk. When comparing LCPD patients and controls, we found no significant association between the defined genetic haplotypes and the risk of suffering from the disease (odds ratio 1.2, 95% confidence intervals 0.7 to 1.7). However, when severity at diagnosis was considered for each haplotype, we found that 67% of the defined high-risk haplotypes for thrombophilia and potential adverse extracellular matrix remodeling were classified as Catterall IV stage, whereas just 29% of the intermediate haplotypes were classified as Catterall IV (*p* = 0.05) (Table 3).

**Table 3.** Haplotype distributions and the severity of LCPD hips based on Catterall classification.

	Haplotypes			<i>p</i>
	Low Risk *	Intermediate Risk *	High Risk *	
Catterall I	1 (3.2%)	1 (7.1%)	1 (16.7%)	0.05
Catterall II	2 (6.5%)	5 (35.7%)	0	
Catterall III	16 (51.6%)	4 (28.6%)	1 (16.7%)	
Catterall IV	12 (38.7%)	4 (28.6%)	4 (66.6%)	

\* Low-risk haplotypes: a combination of normal homozygous status for the *PLA2* (A1A1) polymorphism with normal homozygous (CC) and heterozygous (CT) status for the C677T mutation of *MTHFR*. Intermediate-risk haplotypes: heterozygous for the *PLA2* (A1A2) polymorphism plus normal homozygous (CC) or heterozygous (CT) for the C677T mutation of the *MTHFR* gene. High-risk haplotypes: a combination of homozygous *MTHFR* (TT) or *PLA2* (A2A2).

None of the patients with LCPD or the controls were classified as having genetic haplotypes with a substantial risk of thrombosis (homozygous for factor V Leiden or homozygous for prothrombin G20210A).

As an observational study with no intervention, surgery decisions were not influenced by the presence/absence of the studied polymorphisms, but by age, gender, and progression. Thus, our study design did not allow us to perform a multivariate analysis in order to define the role of the polymorphisms in the outcome according to Stulberg classification. However, after a six-year follow-up, 20% of the patients (10 out of 51 hips)

had a non-favorable outcome with Stulberg grades IV–V, even after surgery. According to our results, the presence of the high-risk haplotypes (homozygous for *MTHFR*) should be considered in diagnosing the severity of LCPD, as up to 50% (two out of four) of the patients had Stulberg IV–V outcomes (three out of four in children under 6 years old).

#### 4. Discussion

It is generally accepted that the disruption of the blood supply to secondary ossification centers in the femoral epiphyses is a key element for avascular necrosis, resulting in deformity of the femoral head, although there are few studies that address the implication of inherited thrombophilic status in the severity of LCPD. There is also evidence that remodeling of the extracellular matrix may be important in processes linked to mineralization and necrosis of the femoral head, and some thrombophilic factors involved in tissue damage after ischemic processes can also be implied in extracellular matrix remodeling mechanisms, thus related to the severity of LCPD.

In the present study, we analyzed the potential association of different genetic polymorphisms with a demonstrated risk for thrombosis and a potential disturbed matrix remodeling with the risk and severity of LCPD. As well as promoting coagulation, platelets are active in fibrinolysis, wound healing, angiogenesis, and bone formation and remodeling [20], with the platelet membrane glycoprotein (GP) IIb/IIIa being a central molecule in platelet adhesion, aggregation, and clot-forming process. The P1A1/A2 (rs5918) polymorphism in the GPIIb/IIIa genes is a demonstrated genetic factor of prothrombotic tendency, along with commonly recognized inherited thrombophilic factors such as the C677T polymorphism of *MTHFR*, classically associated with ischemic events, factor V Leiden, and the G20210A mutation in the prothrombin gene.

We observed that the presence of the P1A2 platelet polymorphism and/or the TT homozygous status for the C677T polymorphism of *MTHFR* are both genetic conditions associated with the severity of LCPD at the time of diagnosis defined by Catterall stages III and IV. In our cohort, we did not observe a significant association between the presence of any other of the prothrombotic haplotypes and the risk of developing LCPD. Only for factor V Leiden mutation did we observe a significant trend related to the risk of Perthes disease (odds ratio 2.9; 95% confidence intervals, 0.2–47.8). These results are concordant with the findings of a recent meta-analysis [8], showing factor V Leiden mutation as the only prothrombotic polymorphism significantly related to Perthes disease.

The potential clinical impact of P1A2 polymorphism on the platelet glycoprotein IIIa gene has been investigated in several diseases in which thrombus formation tissue and remodeling mechanisms are key pathogenic factors [21,22], although never in LCPD. GPIIb/IIIa is the central molecule in platelet adhesion and aggregation by the high-affinity binding of fibrinogen, and the isoform P1A2 is associated with conformational changes in GPIIb/IIIa, which might exert an effect on the platelets' nanomechanics as well as on the signaling pathways by triggering thrombotic events [23].

Metabolic changes associated with the polymorphic variants of *MTHFR* may increase the incidence of LCPD or potentially alter the recovery patterns of the necrotic head. There is a proven relationship between the mutated variant of *MTHFR* and mild–moderate hyperhomocysteinemia, and it has been suggested that endothelial cell aggression may be the initial mechanism by which hyperhomocysteinemia causes thrombosis. This situation interferes with tissue remodeling; therefore, differences in *MTHFR* activity also have a potential association with remodeling of the extracellular matrix, contributing to the pathogenesis of LCPD. In our study, we found that the four children with homozygous mutations of *MTHFR* had a severe form of the disease (Stage IV Catterall).

We did not observe any significant relationship between the other studied prothrombotic polymorphisms and the risk or severity of LCPD. Moreover, although some authors found that homozygous forms of the factor V Leiden mutation may play some role in the clinical course of LCPD, particularly in the more severe forms, we did not observe this association in our study [24].

The extent of epiphyseal involvement is one of the prognostic factors in LCPD. The greater the extent of the epiphyseal lesion, the greater the likelihood of collapse and deformity, and the worse the long-term outcomes (early osteoarthritis). The Catterall radiological classification of the extent of the disease continues to present it as the most important predictor of evolution for patients classified in groups III and IV [12]. However, although it has been used as a marker of severity and prognosis of the disease, it is questionable whether Catterall classification is clinically useful for making treatment decisions for LCPD patients. All patients in our LCPD cohort were classified and followed up by the same specialist. We found that the occurrence of at least one PIA2 allele or two alleles (homozygote) for the C677T polymorphism of *MTHFR* presented a significantly increased risk of having Catterall III or IV LCPD ( $p = 0.05$ ); thus, their screening in at-risk children might be useful in the future as prognosis markers. In our cohort, all LCPD patients homozygous for the C677T mutation of *MTHFR* had a severe form at diagnosis (Catterall group IV).

As an observational study with no intervention, surgery decisions were not influenced by the presence/absence of the studied polymorphisms but by age, gender, and progression. However, we observed that according with our results, the presence of the high-risk haplotypes (homozygous for *MTHFR*) should be considered in the outcome of LCPD, especially for children under 6 years of age).

It is likely that in the development of LCPD, different etiopathogenic pathways simultaneously intervene; however, our findings, although limited by the sample size, rule out a significant role for the genetic thrombophilic status. However, severity at diagnosis is associated with the presence of polymorphisms disturbing extracellular matrix remodeling. Precisely determining the pathways that trigger the avascular necrosis process will be relevant for the early detection of LCPD, for the development of possible biomarkers, and for the implementation of medical therapeutic strategies that, together with the appropriate surgical attitude, will offer the best functional results for children affected by LCPD. However, our results are concordant with our initial hypothesis. Multicenter studies with larger sample sizes will be necessary to confirm our results.

## 5. Conclusions

Our results showed that inherited thrombophilic variants are not significant risk factors for LCPD but are associated with different levels of disease severity; this was observed, in particular, for those polymorphisms related with platelet adhesion and aggregation, cell injury, and adverse extracellular matrix remodeling. Subjects with an rs1801133(T) variant in *MTHFR* and an rs5918(C) variant encoding the A2 allele of the platelet glycoprotein displayed an increased risk of more severe forms of LCPD in the acute phase (Catterall III–IV). Being homozygous for the rs1801133(TT) variant or just having one copy of the rs5918(C) variant appeared to be associated with an increased risk for more severe forms of LCPD (Catterall groups IV and III) in the acute phase. The presence in homozygosis of the TT variant in *MTHFR* is suggested to be a risk factor for severe outcome (Stulberg IV–V after 6-year follow-up). Future multicenter studies would allow us to evaluate the association between LCPD and mechanisms of platelet activation and the release of substances into the extracellular space, which are determinants of tissue damage and repair mechanisms and are thus implicated in the pathogenesis of LCPD.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.G.-L., M.I.P.-N., and M.D.G.-A.; methodology, M.D.G.-A., M.T.A., M.Á.B., C.A., and D.G.-L.; validation, M.Á.B. and D.G.-L.; formal analysis, M.T.A. and M.Á.B.; investigation, M.D.G.-A. and C.A.; data curation M.D.G.-A. and M.Á.B.; writing—original preparation, M.D.G.-A. and D.G.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by a grant from the Spanish government, 2002–2005, grant number FIS (00/0015) and University of Cantabria code 06.3842.64001 and The APC was funded by University of Cantabria-IDIVAL.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethical Committee of the University Hospital (CEIC-C: Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria in 2005 included in the AVENA study protocol and in the UC 15/08/2018.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Stulberg, S.D.; Cooperman, D.R.; Wallensten, R. The natural history of Legg-Calve-Perthes disease. *J. Bone Jt. Surg.* **1981**, *63*, 1095–1108. [[CrossRef](#)]
2. Mose, K. Methods of measuring in Legg-Calvé-Perthes disease with special regard to the prognosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1980**, *150*, 103–109.
3. Catterall, A. The natural history of Perthes' disease. *J. Bone Jt. Surg.* **1971**, *53*, 37–53. [[CrossRef](#)]
4. Herring, J.A.; Kim, H.T.; Browne, R. Legg-Calvé-Perthes disease. Part I: Classification of radiographs with use of the modified lateral pillar and Stulberg classifications. *J. Bone Jt. Surg.* **2004**, *86*, 2103–2120. [[CrossRef](#)]
5. Shapiro, F.; Connolly, S.; Zurakowski, D.; Menezes, N.; Olear, E.; Jimenez, M.; Flynn, E.; Jaramillo, D. Femoral head deformation and repair following induction of ischemic necrosis: A histologic and magnetic resonance imaging study in the piglet. *J. Bone Jt. Surg. Am.* **2009**, *91*, 2903–2914. [[CrossRef](#)]
6. Sanchis, M.; Zahir, A.; Freeman, M.A. The experimental simulation of Perthes disease by consecutive interruptions of the blood supply to the capital femoral epiphysis in the puppy. *J. Bone Jt. Surg. Am.* **1973**, *55*, 335–342. [[CrossRef](#)]
7. Balasa, V.V.; Gruppo, R.A.; Glueck, C.J.; Wang, P.; Roy, D.R.; Wall, E.J.; Mehlman, C.T.; Crawford, A.H. Legg-Calve-Perthes disease and thrombophilia. *J. Bone Jt. Surg. Am.* **2004**, *86*, 2642–2647. [[CrossRef](#)]
8. Woratanarat, P.; Thaveeratitharm, C.; Woratanarat, T.; Angsanuntsukh, C.; Attia, J.; Thakkinian, A. Meta-analysis of hypercoagulability genetic polymorphisms in Perthes disease. *J. Orthop. Res.* **2014**, *32*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Miyamoto, Y.; Matsuda, T.; Kitoh, H.; Haga, N.; Ohashi, H.; Nishimura, G.; Ikegawa, S. A recurrent mutation in type II collagen gene causes Legg-Calvé-Perthes disease in a Japanese family. *Hum. Genet.* **2007**, *121*, 625–629. [[CrossRef](#)]
10. Liu, Y.F.; Chen, W.M.; Lin, Y.F.; Yang, R.C.; Lin, M.W.; Li, L.H.; Chang, Y.H.; Jou, Y.S.; Lin, P.Y.; Su, J.S.; et al. Type II collagen gene variants and inherited osteonecrosis of the femoral head. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2294–2301. [[CrossRef](#)]
11. Hardcastle, P.H.; Ross, R.; Hamalainen, M.; Mata, A. Catterall grouping of Perthes' disease. An assessment of observer error and prognosis using the Catterall classification. *J. Bone Jt. Surg. Br.* **1980**, *62*, 428–431. [[CrossRef](#)]
12. Wiig, O.; Terjesen, T.; Svenningsen, S. Prognostic factors and outcome of treatment in Perthes' disease. *J. Bone Jt. Surg.* **2008**, *90*, 1364–1371. [[CrossRef](#)]
13. Higuchi, R. Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications* **1989**, *2*, 1–3.
14. Weiss, E.J.; Bray, P.F.; Tayback, M.; Schulman, S.P.; Kickler, T.S.; Becker, L.C.; Weiss, J.L.; Gerstenblith, G.; Goldschmidt-Clermont, P.J. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1090–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Frosst, P.; Blom, H.J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C.A.; Matthews, R.G.; Boers, G.J.; Den Heijer, M.; Kluijtmans, L.A.; Van Den Heuvel, L.P.; et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* **1995**, *10*, 111–113. [[CrossRef](#)]
16. Bertina, R.M.; Factor, V. Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 1678–1683. [[CrossRef](#)]
17. Poort, S.R.; Rosendaal, F.R.; Reitsma, P.H.; Bertina, R.M. A common genetic variant in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increased in venous thrombosis. *Blood* **1996**, *88*, 3698–3703. [[CrossRef](#)]
18. Lim, M.Y.; Deal, A.M.; Kim, S.; Musty, M.D.; Conard, J.; Simioni, P.; Dutrillaux, F.; Eid, S.S.; Middeldorp, S.; Halbmayer, W.M.; et al. Thrombophilic risk of individuals with rare compound factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms: An international case series of 100 individuals. *Eur. J. Haematol.* **2016**, *97*, 353–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Catterall, A.; Pringle, J.; Byers, P.D. A review of the morphology of Perthes' disease. *J. Bone Jt. Surg. Br.* **1982**, *64*, 269. [[CrossRef](#)]
20. Nurden, A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* **2011**, *105* (Suppl. 1), S13–S33. [[CrossRef](#)]
21. Garcia-Ribes, M.; Gonzalez-Lamuño, D.; Hernandez-Estefania, R.; Colman, T.; Pocovi, M.; Delgado-Rodriguez, M.; Garcia-Fuentes, M.; Revuelta, J.M. Polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa gene in patients with coronary stenosis. *Thromb. Haemost.* **1998**, *79*, 1126–1129.
22. Michelson, A.D.; Furman, M.I.; Goldschmidt-Clermont, P.; Mascelli, M.A.; Hendrix, C.; Coleman, L.; Hamlington, J.; Barnard, M.R.; Kickler, T.; Christie, D.J.; et al. Platelet GP IIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* **2000**, *101*, 1013–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- 
23. Todinova, S.; Komsa-Penkova, R.; Krumova, S.; Taneva, S.G.; Golemanov, G.; Georgieva, G.; Tonchev, P.; Tsankov, B.; Beshev, L.; Balashev, K.; et al. PIA2 Polymorphism in Glycoprotein IIb/IIIa Modulates the Morphology and Nanomechanics of Platelets. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2017**, *23*, 951–960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  24. Szepesi, K.; Pósan, E.; Hársfalvi, J.; Ajzner, E.; Szücs, G.; Gáspár, L.; Csernátóny, Z.; Udvardy, M. The most severe forms of Perthes' disease associated with the homozygous Factor V Leiden mutation. *J. Bone Jt. Surg. Br.* **2004**, *86*, 426–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]