



Università degli Studi di Salerno
Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria
“Scuola Medica Salernitana”

Dottorato di Ricerca in:
MEDICINA TRASLAZIONALE DELLO SVILUPPO E
DELL’ INVECCHIAMENTO ATTIVO

Ciclo XXXII

Percorso: MEDICINA TRASLAZIONALE E CLINICA

Tesi di dottorato in:

**“ESPRESSIONE GENICA INDOTTA DALL’ORMONE
SOMATOTROPO NEI MONOCITI DI BAMBINI SANI E CON DEFICIT
DI GH”**

COORDINATORE DOTTORATO

Chiar.mo Prof. Palmiero Monteleone

CANDIDATA

Dott.ssa Tortora Anna

Matr.8800900016

TUTOR DOTTORATO

Chiar.mo Prof. Mario Vitale

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

INDICE

RIASSUNTO

I. INTRODUZIONE

- 1.1 Fisiopatologia dell'asse somatotropo**
- 1.2 Deficit di GH: epidemiologia e diagnosi**
- 1.3 Ormone somatotropo: effetti cellulari e genetici**

II. OBIETTIVI

III. PROGRAMMA SPERIMENTALE

IV. PAZIENTI, MATERIALI E METODI

- 4.1 Selezione e arruolamento dei pazienti**
- 4.2 Isolamento e purificazione dei monociti**
- 4.3 Test ELISA per la quantizzazione dell'IL-8**
- 4.4 Estrazione dell'RNA**
- 4.5 RNA-Sequencing (RNA-Seq)**
- 4.6 Analisi bioinformatica e Gene Ontology**

V. RISULTATI

- 5.1 Pazienti arruolati e caratteristiche cliniche**
- 5.2 Purificazione dei monociti**
- 5.3 Risposta dei monociti al GH**
- 5.4 Analisi RNA-Seq**
- 5.5 Espressione genica differenziale tra monociti di bambini sani e con deficit di GH**

5.6 Espressione genica indotta dal GH nei monociti

5.7 Espressione genica differenziale tra monociti di bambini sani e con deficit di GH, stimolati con GH in coltura

VI. DISCUSSIONE

VII. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

VIII. BIBLIOGRAFIA

RIASSUNTO

L'ormone somatotropo (GH) ha effetti trascrizionali sulle cellule di molti organi, direttamente mediante l'attivazione del proprio recettore (GHR) o indirettamente attraverso induzione dell'IGF-1 o di altri mediatori. La presenza del GHR in quasi tutti i tessuti cellulari rende l'azione del GH sistemica anche se, ad oggi, ancora non ben caratterizzata. Il sistema immunitario è tra i distretti in cui è documentato l'effetto dell'ormone somatotropo mediante meccanismi tuttora poco conosciuti.

Obiettivo primario di questo studio è determinare l'effetto trascrizionale del GH sui monociti di sangue periferico. Queste cellule sono state scelte per la significativa espressione del GHR sulla propria superficie e perché facilmente accessibili. Sebbene la risposta trascrizionale all'ormone somatotropo sia tessuto specifica, lo studio degli effetti del GH sui monociti può servire da modello per altri tipi cellulari ed evidenziare differenze tra soggetti sani e affetti da deficit di GH (GHD).

La diagnosi di GHD, durante l'età evolutiva, si basa classicamente sulla valutazione clinica associata alle indagini laboratoristiche (test di stimolo asse GH-IGF-1) e radiologiche. Benché i test di provocazione rappresentino il *gold standard* diagnostico, presentano una scarsa riproducibilità e accuratezza e sono caratterizzati da un numero considerevole di falsi positivi e talvolta negativi.

Obiettivo secondario di questo studio è identificare quadri trascrizionali differenziali tra soggetti sani e con GHD.

A tale scopo, è stata confrontata l'espressione genica di monociti di bambini sani e con GHD, in coltura, in condizioni basali e dopo stimolo con GH ricombinante (rh-GH).

Sono stati selezionati due gruppi di 12 soggetti, *gruppo S*: bambini sani di sesso maschile con altezza e velocità di crescita normali e *gruppo D*: bambini di pari sesso ed età e affetti da GHD, non ancora in terapia sostitutiva. Sono stati purificati i monociti di sangue periferico per sottrazione con anticorpi monoclonali e il livello di purezza è stato determinato mediante citofluorimetria a flusso laminare con anticorpi monoclonali. I monociti sono stati coltivati per 24 ore con e senza rh-GH. L'RNA totale è stato estratto e congelato fino all'analisi che è stata eseguita contemporaneamente per tutti i punti sperimentali mediante metodologia *Next Generation Sequencing* su piattaforma Illumina. L'espressione differenziale di mRNA è stata analizzata confrontando i monociti di bambini sani e con GHD, stimolati in coltura con rh-GH o non stimolati: GHD non stimolati (*D-CNTR*) vs sani non stimolati (*S-CNTR*); sani non stimolati (*S-CNTR*) vs sani stimolati (*S-GH*); GHD non stimolati (*D-CNTR*) vs GHD stimolati (*D-GH*); GHD stimolati (*D-GH*) vs sani stimolati (*S-GH*).

L'analisi tra i gruppi *D-CNTR* vs *S-CNTR* individuava 58 geni con espressione differenziale. 23 geni, inoltre, risultavano modulati dal GH nei bambini sani e 4 geni nei bambini con GHD. L'analisi differenziale tra i gruppi *D-GH* vs *S-GH*, invece, identificava 150 geni con espressione differenziale.

Infine, l'analisi mediante software *Ingenuity Pathway Analysis* evidenziava un aumento significativo dei pathways immunitari *NFAT* e di *maturazione delle cellule dendritiche* e un incremento coerente nell'espressione di marcatori dendritici (*HLA-A*, *HLA-C*, *CCR7*) nei monociti di bambini con GHD rispetto ai bambini sani, dopo stimolo in coltura con GH ricombinante.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno dimostrato un chiaro effetto trascrizionale del GH sui monociti, diretto e indiretto attraverso mediatori

intermedi, suggerendo di valutare più approfonditamente lo stato pro-infiammatorio dei bambini con deficit dell'ormone della crescita.

Inoltre, questo studio ha identificato un profilo di espressione genica dei monociti di bambini con GHD che, una volta verificato in un numero più ampio di pazienti, potrebbe rappresentare una alternativa ai test di stimolo e orientare la diagnosi del deficit di GH.

Il nostro studio, infine, apre prospettive future ad ulteriori lavori che abbiano, come obiettivo, quello di individuare, un profilo trascrizionale o singoli geni specifici per la condizione di GHD.

I. INTRODUZIONE

1.1 FISIOPATOLOGIA DELL'ASSE SOMATOTROPO

La crescita e il metabolismo di un individuo nel periodo fetale e poi nell'infanzia, fanciullezza e pubertà dipendono da numerosi segnali che vedono impegnati il sistema nervoso e ghiandole endocrine tra le quali l'ipofisi. Quest'ultima, direttamente e indirettamente, controlla diversi organi endocrini e non endocrini (1).

Il corretto sviluppo dell'ipofisi è regolato da specifici geni e fattori trascrizionali che presiedono al differenziamento e alla differenziazione delle cinque linee cellulari ipofisarie (tra cui le cellule somatotrope) in grado di secernere ormoni, fattori di stimolo e/o inibizione mediante complessi pathways intracellulari (2).

Le cellule secernenti l'ormone somatotropo (GH), fanno parte di una comune linea di differenziazione delle cellule ipofisarie (3); questo spiega perché, nello stesso paziente, non sia infrequente rinvenire contemporaneamente la carenza anche di altri ormoni (2).

Il ritardo dell'accrescimento, comunque, non si basa necessariamente su uno o più deficit ormonali in quanto esistono numerosi altri fattori (ad esempio l'alimentazione, l'abuso di alcuni farmaci, la celiachia o altre patologie malassorbitive ecc.), in grado di influire ed interferire con il raggiungimento della statura target definitiva (3).

La secrezione del GH, in particolare, è regolata dall'azione coordinata del Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) e della Somatostatina (SS) che, rispettivamente, stimolano ed inibiscono il suo rilascio (3) ed è, inoltre, controllata da un complesso meccanismo di feedback negativo mediato dall'Insulin-like Growth Factor (IGF-1) che esplica la sua azione inibitoria sia a livello ipotalamico

che ipofisario (3). Anche altri ormoni, tra cui gli steroidi sessuali e i glucocorticoidi, i peptidi gastrointestinali ed alcuni pathways glicometabolici partecipano alla regolazione secretoria dell'ormone della crescita che si contraddistingue per essere episodica e con picco notturno (2,3).

Soggetti con magrezza patologica si contraddistinguono per aumentata secrezione di GH e ridotti livelli di IGF-1, indici entrambi di resistenza all'ormone della crescita (4); al contrario, bambini obesi hanno una normale o addirittura alta concentrazione plasmatica di IGF-1 associata a riduzione della secrezione spontanea o stimolata di GH (5), segno di maggiore responsività all'azione somatotropa (6,7).

Il processo eziopatogenetico responsabile della correlazione GH-Body Mass Index (BMI), ad oggi, non è stato ancora chiarito; si suppone che alla base possa esserci un meccanismo multifattoriale che includa l'azione di specifici fattori metabolico-ormonali tra cui l'insulina, gli acidi grassi liberi, la leptina (5) e il fattore di crescita dei fibroblasti 21 (FGF-21), capace, quest'ultimo, di diminuire l'espressione del gene IGF-1 in condizioni di ridotto apporto calorico inibendo l'attivazione del fattore trascrizionale STAT5b (4).

1.2 DEFICIT DI GH: EPIDEMIOLOGIA E DIAGNOSI

La prevalenza del deficit di crescita su base non endocrina e correlata a malnutrizione è più significativa nei Paesi con carenti condizioni socio-economiche e sanitarie (8).

La valutazione della statura si avvale di tre parametri fondamentali (8):

- Altezza SDS (HSDS) che esprime il numero di deviazioni standard inferiori o superiori alla statura media di una popolazione dello stesso sesso ed età
- Correlazione tra HSDS e Midparental height (MPH) SDS corretto per sesso

- Velocità di crescita misurata in cm/anno o in SDS per età e sesso valutata a distanza di circa 12 mesi, preferibilmente.

La definizione di bassa statura patologica differisce in base all'età del paziente: (9,10):

per i bambini di età inferiore a tre anni, le misurazioni dell'altezza hanno alta variabilità e ridotta accuratezza e il criterio diagnostico basato sulla distanza dall'altezza target e/o sulla deflessione staturale presenta un basso valore predittivo (11). Pertanto, in questo caso, si definisce affetto da bassa statura patologica un soggetto con altezza < -3 SDS oppure < -2.5 SDS confermata in più controlli nell'ultimo anno (11).

Nei pazienti di età superiore ai 3 anni, oltre ai comuni parametri auxologici già descritti (HSDS, velocità di crescita, correlazione HSDS-MPH SDS), è necessario considerare altri fattori quali dismorfie e disproporzioni corporee, oppure una storia alla nascita di “*Small for gestational age*” (SGA) (11).

La condizione di SGA, nello specifico, descrive tutti i bambini nati con peso e/o lunghezza inferiori a -2 SDS, da non confondere con la condizione di *IUGR* (*Intrauterine Growth Retardation*) che si riferisce a una ridotta crescita intrauterina (peso fetale stimato $< 10^{\circ}$ percentile) confermata in almeno due misurazioni (12) e che talvolta può risolversi anche prima del parto.

Identificare i bambini nati SGA è importante perché questi pazienti hanno un tasso più alto di mortalità e morbilità perinatale, un rischio maggiore di sviluppare, in età adulta, malattie cardiovascolari, renali e metaboliche (diabete mellito, insulino-resistenza, dislipidemia), una maggiore incidenza di disturbi neuro-cognitivi e nel 10% dei casi falliscono nel recupero staturale (*catch up growth*) entro i 4 anni di vita andando incontro, quindi, a bassa statura patologica (13-15).

Sebbene sia difficile estrapolare un dato esatto di prevalenza del deficit di GH (*Growth Hormone Deficiency-GHD*) a causa della variabilità degli studi epidemiologici presenti in letteratura, il GHD è considerato una causa rara di bassa statura, con una incidenza di circa 1/4000 nati vivi (16).

La disfunzione secretiva dell'ormone della crescita può presentarsi isolata (*IGHD*) oppure combinata ad uno o più deficit ipofisari e nei casi frequenti in cui la sua base eziopatogenetica rimanga misconosciuta, viene descritta la condizione chiamata "*deficit idiopatico di GH*" (1,2).

Il deficit di GH, inoltre, può essere congenito (presente già prima della nascita) oppure acquisito, quando consegue a lesioni ipotalamo-ipofisarie avvenute durante o nel post-partum (1,2).

Più nello specifico, il GHD congenito può essere dovuto a malformazioni della linea mediana, alterazioni genetiche del cluster somatotropo o mutazioni di alcuni fattori trascrizionali implicati nell'embriogenesi ipofisaria (Prop-1, Pit-1, Hesx1, Lhx3, Lhx4) (1,2). Il deficit acquisito, invece, è causato principalmente da eventi perinatali quali emorragie intracraniche, trombosi, asfissia o parto distocico oppure post-natali (neoplasie, processi infiltrativi o autoimmuni, infezioni, eventi post-traumatici ecc.) (1,2).

La diagnosi di deficit di GH durante l'età evolutiva si basa classicamente sulla valutazione clinica associata alle indagini laboratoristiche (test di stimolo asse GH-IGF-1) e radiologiche (17).

I valori fisiologici del GH sono pulsatili, molto bassi e al limite della sensibilità dei test disponibili, per cui il dosaggio del GH sierico come tale non è in grado di documentare una carenza di secrezione. Per tale motivo, la diagnosi di GHD necessita, attualmente, dell'esecuzione di test di stimolo della secrezione di GH, ad eccezione delle forme sospette congenite (nel neonato o nei primi 2 anni di vita)

caratterizzate da bassi valori di ormone somatotropo in corso di ipoglicemia associati ad almeno un altro deficit ipofisario e/o a malformazioni dell'adenoipofisi, peduncolo e/o neuroipofisi.

Benché tali test rappresentino il gold standard per la diagnosi di insufficiente secrezione del GH, presentano una scarsa riproducibilità e accuratezza e sono caratterizzati da un numero considerevole di falsi positivi e, talvolta negativi (1).

Diversi autori, infatti, hanno dimostrato che una parte dei bambini a cui era stata fatta diagnosi di deficit di GH isolato idiopatico, quando ritestati dopo alcuni mesi, mostravano risposta normale dell'ormone ai test di stimolo (2,3).

Esistono diverse ragioni per spiegare questa variabilità (1).

La nutrizione e il metabolismo giocano un ruolo chiave nella regolazione dell'asse GH-IGF-1 (18).

La valutazione random delle concentrazioni sieriche di GH, come descritto, non ha valore clinico in quanto la secrezione dell'ormone è pulsatile con picchi notturni e valori estremamente ridotti tra un picco e l'altro.

La somministrazione di steroidi gonadici nei giorni precedenti il test (*Priming*) è stata suggerita nei bambini in età pubere con assenza dei caratteri sessuali secondari; questo, allo scopo di ridurre il numero dei falsi positivi considerato il feedback positivo che gli ormoni sessuali esercitano sulla secrezione somatotropa; il priming, tuttavia, rimane, ad oggi, un argomento ancora dibattuto (19).

La disfunzione secretiva viene comunemente confermata quando il picco di GH non raggiunge il cut-off stabilito in almeno due test di stimolo praticati in due giorni differenti (17).

Numerosi test di provocazione sono stati proposti negli ultimi 50 anni per valutare la capacità secretoria delle cellule somatotrope (20); il cut-off di risposta era stato inizialmente scelto tra 5 e 7 $\mu\text{g/L}$ e poi successivamente aumentato a 10 $\mu\text{g/L}$

secondo raccomandazione della “*GH Research Society*” (19), anche se, ad oggi, alcuni Paesi utilizzano arbitrariamente valori soglia compresi tra 3 e 5 µg/l (17,21). In Italia, la Nota AIFA 39 (G.U. 154/2014) ha stabilito un cut-off di 8 ng/mL per valutare la risposta ai test farmacologici classici ovvero GHRH, ipoglicemia insulinica, clonidina, arginina, L-dopa, glucagone e di 20 ng/mL, invece, quando ad essere utilizzato è il test combinato con GHRH + arginina somministrato in un'unica giornata.

Oltre al valore soglia del GH dopo test, è l'attendibilità del test in sé ad essere ancora dibattuta; questo, per la mancanza di valori di riferimento in controlli normali, per la variabilità nella risposta legata al tipo di stimolo, all'età, al genere, allo stadio puberale e al peso e, infine, per l'utilizzo di differenti metodiche laboratoristiche nella misurazione del GH sierico.

In uno studio disegnato per analizzare possibili cause responsabili di una diagnostica non corretta di deficit somatotropo (*GHD falsi positivi*), è stato esaminato l'effetto dell'apporto calorico sulla secrezione del GH. I test di stimolo con arginina o insulina hanno evidenziato un picco ormonale marcatamente più significativo quando venivano praticati tre giorni dopo una dieta ipocalorica rispetto alla condizione basale (22).

Nei bambini molto piccoli, inoltre, il test di stimolo con GHRH+arginina non è discriminante tra la condizione di deficit e quella di normalità (11) mentre l'insulin tolerance test (ITT) non è raccomandato a causa del rischio di severa ipoglicemia dovuta alla maggiore sensibilità insulinemica in questa fascia di età (23).

La riproducibilità del test al glucagone, invece, è stata valutata in uno studio condotto su bambini con età inferiore a sei anni e deficit somatotropo confermato dal picco di GH < 10 µg/L dopo test di stimolo con insulina e arginina (24); i risultati hanno mostrato che la risposta del GH al glucagone era significativamente

maggiore rispetto ai valori registrati nei due test precedenti ed inoltre correlava inversamente con l'età del paziente ma non con il BMI (24), sebbene la gran parte dei lavori avessero dimostrato in tutti i soggetti obesi una riduzione del picco del GH dopo test di stimolo (25).

Basandoci su queste considerazioni, è chiaro che i test di provocazione utilizzati per il work-up diagnostico del deficit somatotropo hanno bassa riproducibilità, sensibilità e specificità (17) e talvolta, come ha dimostrato una survey condotta tra i membri appartenenti alla Società Europea di Endocrinologia Pediatrica, non vengono addirittura utilizzati nella pratica clinica (9).

L'IGF-I, di sintesi principalmente epatica e mediatore chiave dell'azione del GH, viene comunemente utilizzato nel percorso diagnostico del GHD. I suoi livelli mostrano variazioni diurne molto piccole, pertanto la loro misurazione rappresenta un buon indice della secrezione dell'ormone della crescita (17). Le concentrazioni di IGF-I sono dipendenti dallo stato nutrizionale, dal genere e dall'età, con valori più bassi nella prima infanzia e graduale aumento durante gli anni successivi ed in pubertà. L'IGF-1 o Somatomedina C, circola legata all'IGFBP-3 e ad una subunità acidolabile (ALS), le cui secrezioni sono GH dipendenti. Molti studi hanno dimostrato che valori di IGF-1 e/o IGFBP-3 inferiori a -2 SDS sono fortemente suggestivi di una disfunzione somatotropa (quando tutte le altre cause di carenza ormonale siano state già escluse) anche se, in molti pazienti con GHD, la loro concentrazione plasmatica viene descritta il più delle volte normale (19).

Assieme alle indagini biochimiche, anche la risonanza magnetica nucleare (RMN) della regione ipotalamo-ipofisaria rientra nell'iter diagnostico del deficit di GH (11). Le anomalie morfologiche possono dipendere da difetti nello sviluppo (ereditari o sporadici) o da condizioni acquisite (quali ad esempio le neoplasie). Tra le prime, possono riscontrarsi alterazioni strutturali della ghiandola pituitarica come

l'ipoplasia della regione anteriore o l'ectopia di quella posteriore fino, alle volte, alla completa agenesia; in alcuni pazienti è stata descritta la sindrome da interruzione del peduncolo ipotalamo-ipofisario ed, inoltre, sono state riportate malformazioni severe della linea mediana quali l'oloprosencefalia o il meningocele transfenoidale (1,2). Difetti gravi del cranio o della linea mediana del viso sono stati associati con il deficit di GH, isolato o combinato, che di solito si manifesta in maniera permanente soprattutto se presente alterazione secretiva delle altre tropine.

1.3 ORMONE SOMATOTROPO: EFFETTI CELLULARI E GENETICI

Il cluster del gene GH è formato da 5 geni strutturalmente simili che in direzione 5'→3' sono: GH-1 - CSHP - CSH - GH-2 - CSH-2.

Il cluster comprende circa 65,000 coppie di basi ed è collocato sul braccio lungo del cromosoma 17 nella banda q22-24.

Il gene GH-1 codifica per il GH umano (GH-N), un peptide di 191 amminoacidi la cui espressione è regolata da elementi e fattori cis e trans-acting, rispettivamente. Approssimativamente il 75% del GH circolante proviene dal gene espresso nell'adenoipofisi che codifica per l'isoforma più importante di 22-k-Da, mentre splicing alternativi del trascritto possono dar vita ad altre isoforme definite minori.

Il gene GH-2 codifica per una proteina (GH-V) che è espressa principalmente nella placenta piuttosto che nella ghiandola pituitaria e differisce dalla sequenza primaria del GH-N per 13 amminoacidi. Tale ormone sostituisce quello ipofisario nella circolazione materna dalla seconda metà della gravidanza (**Figura1**)

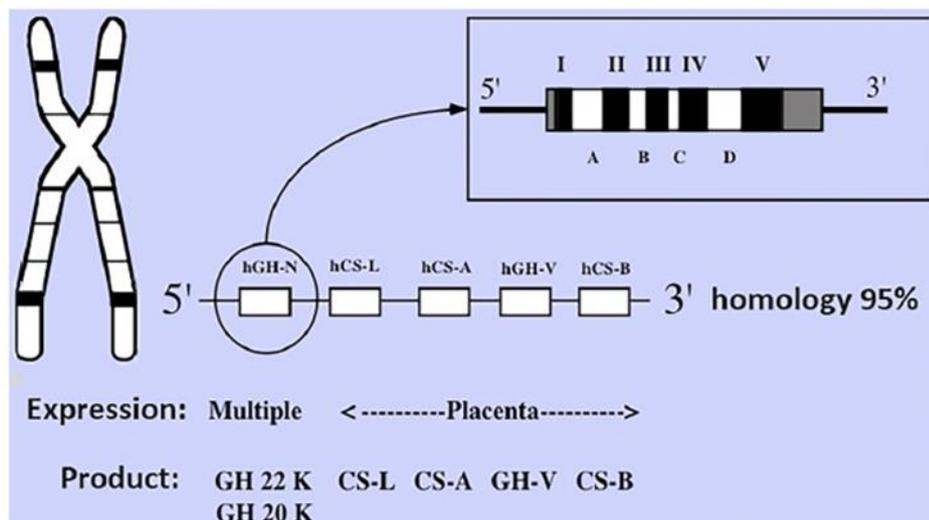
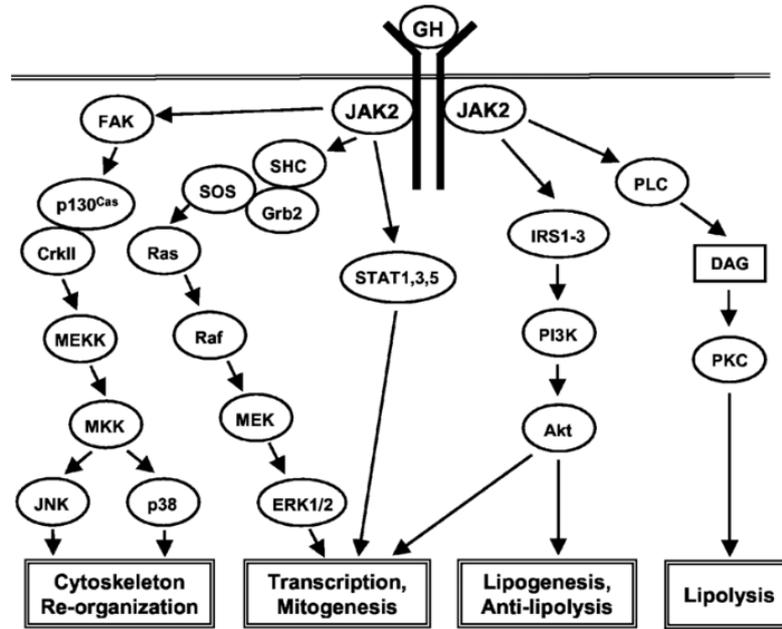


Figura 1: Geni appartenenti al cluster del GH con elevata omologia di sequenza (95%)

L'ormone somatotropo si lega sequenzialmente e con alta affinità al dominio extracellulare di due distinti recettori (GHR) permettendone così la dimerizzazione e quindi l'attivazione della proteina tirosinchinasica Janus kinase (Jak2) (26,27). Jak2 determina la fosforilazione di proteine citoplasmatiche che a loro volta portano all'induzione di multipli segnali intracellulari tra le quali le cascate Ras - Raf - Mek - Erk e PI3K - Akt (26,27) (**Figura 2**). Tra le vie di segnale attivate dal GH vi è anche quella che include i fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia signal transducer and activator of transcription (STAT), responsabili della gran parte degli effetti del GH sull'espressione genica (28). Il GH induce STAT 1, 3, 5a e 5b in differenti cellule bersaglio (29); una volta attivate, queste proteine formano omodimeri (e etrodimeri nel caso di STAT 1 e 3) e, raggiunto il nucleo, legano il DNA nella regione promotrice di geni target e ne inducono la trascrizione (30).



Schematic representation of GHR signaling pathways.

Figura 2. Rappresentazione schematica dei pathways cellulari GH-dipendenti

Il GH ha azione anabolica diretta o indiretta su diversi distretti corporei ed è coinvolto nei processi di crescita, differenziazione e metabolismo cellulare di alcuni tessuti bersaglio tra cui il fegato, il muscolo scheletrico, l'osso e il tessuto adiposo (31).

In particolare, a livello epatico, l'ormone della crescita agisce aumentando i livelli di glucosio, in tutti i casi di ipoglicemia, mediante la stimolazione della gluconeogenesi e glicogenolisi, contemporaneamente (31). Nel fegato, il GH modula alcuni segnali implicati nel metabolismo lipidico e nella secrezione dei trigliceridi, come dimostrano alcuni studi fatti su epatociti murini knockout per proteine di segnale GH dipendenti, recettore del GH, JAK2 e STAT5, in cui gli autori hanno osservato un incremento della deposizione del grasso e quindi un tasso maggiore di steatosi epatica (32,33). Sempre a livello epatico, l'ormone della crescita aumenta l'ossidazione degli acidi grassi (34), induce la fosforilazione del fattore trascrizionale SREBP-1a, coinvolto nella sintesi del colesterolo (35) e,

infine, stimola la rigenerazione epatica come è riportato in modelli murini in cui la compromissione di pathways specifici GH mediati causava una ridotta proliferazione epatocitaria in seguito a parziale epatectomia (36).

L'effetto del GH sulla composizione corporea è stato ampiamente studiato nel corso degli anni (31). Negli adipociti l'ormone somatotropo stimola il processo di lipolisi e incrementa la concentrazione degli acidi grassi liberi che da alcuni è considerata un marcatore dell'azione in vivo del GH stesso (37). L'effetto lipolitico del GH è, in parte, mediato dalla maggiore attività della lipasi ormone sensibile (HSL) (38) e, in parte, da altri meccanismi tra i quali un alterato profilo di espressione delle CIDEA (cell death-inducing DFF45-like effector-A) ovvero delle LDAPs (lipid droplet-associating protein) e/o una modifica del pattern secretivo di alcune adipochine quali l'adiponectina (39,40). Oltre all'azione lipolitica, GH e IGF-1 sono coinvolti nelle vie di segnale che modulano la proliferazione, la differenziazione e la senescenza delle cellule pre-adipocitarie (39) come suggerito da alcuni studi nei quali Fos e Jun sono stati identificati come geni target del GH (41).

GH ed IGF-1, esercitano un'importante funzione metabolica anche sul tessuto muscolare scheletrico dove agiscono sinergicamente incrementando la sintesi proteica, diminuendone il catabolismo e stimolando i meccanismi di riparazione, rigenerazione e recupero funzionale (31). È interessante che alcuni autori abbiano attribuito direttamente al GH (e non all'IGF-1) la disfunzione metabolica correlata all'insulino-resistenza che si verifica nelle fibre muscolari scheletriche. Infatti, nei topi knockout per il GHR selettivo nel muscolo ma esprimenti regolarmente il recettore dell'IGF-1, è stata dimostrata una diminuzione dell'uptake del 2-deossi-glucosio, una riduzione dei livelli transmembrana del recettore insulinico ed un

aumento della fosforilazione della proteina citoplasmatica insulin receptor substrate-1 (IRS-1) (42).

Come nel muscolo scheletrico, anche nell'osso si suppone che l'ormone somatotropo possa agire in maniera indipendente dall'azione dell'IGF-1, nonostante eserciti in parte il suo effetto stimolandone la sintesi a livello pericondrale (43). Inizialmente, infatti, si pensava che l'IGF-1 fosse di produzione esclusivamente epatica e la sua espressione completamente dipendente dal GH (44); successivamente, è stato dimostrato che l'IGF-1, oltre che dal fegato viene prodotto, assieme al GH, anche dalle stesse cellule su cui entrambi gli ormoni esercitano la propria azione mediante meccanismi autocrini e paracrini (44).

Il GH, come descritto, ha un effetto diretto sull'osso (44); in particolare, è stato osservato che l'ormone somatotropo quando iniettato localmente a livello metafisario, induceva una crescita epifisaria unilaterale (corrispondente al sito di iniezione) (45) e, allo stesso tempo, se aggiunto a colture condrocitarie era in grado di promuoverne la proliferazione (46). C'è da sottolineare, comunque, che l'effetto proliferativo dell'ormone della crescita sulle cellule condrocitarie, dipende, in parte, dalla sintesi locale e GH mediata dell'IGF-1 (47), come dimostrano esperimenti in vitro su condrociti stimolati da GH, in cui la somministrazione contemporanea di anticorpi anti-IGF-1 era in grado di bloccare l'espansione clonale (47). GH e IGF-1, inoltre, partecipano sinergicamente all'accrescimento longitudinale in corrispondenza della piastra epifisaria (44) ma, mentre l'espressione del GHR è stata documentata in tutte le sue zone ad indicare l'azione pleiotropica dell'ormone della crescita, l'IGFR1, invece, è stato riscontrato principalmente nella *zona di proliferazione* segno, questo, di un meccanismo più selettivo dell'IGF-1 e dell'IGF2 nel processo di ossificazione (43). L'IGF-2, in particolare, è stato ampiamente studiato nell'ultimo decennio e si pensa possa avere

un ruolo chiave nella crescita encondrale come descritto in un recente lavoro su topi giovani SOCS2 (-/-) in cui, a differenza di quelli wild-type, la sua concentrazione risultava particolarmente elevata e si supponeva che partecipasse, assieme al GH, al processo di accrescimento mediante una via IGF-1 indipendente (48).

Parallelamente, esperimenti fatti su modelli murini, invece, hanno dimostrato come l'IGF-1 stimoli, attraverso la via mTOR, il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali nella linea osteoblastica e che questo permetta il mantenimento sia della struttura che della massa ossea (49). Nei topi, infatti, la over-espressione osso-specifica di tale pathway comporta un significativo incremento della densità scheletrica e del volume trabecolare, al contrario, una riduzione della sua espressione è responsabile di ridotto accrescimento (50).

Altri studi, inoltre, suggeriscono un ruolo rilevante dell'ormone della crescita anche nella regolazione del sistema ematopoietico, nella sua differenziazione cellulare e funzionalità biologica (44). E' dimostrato, infatti, che la somministrazione di GH ricombinante aumenta la concentrazione di eritropoietina ed emoglobina nei pazienti adulti con GHD (51) e, sempre negli stessi soggetti, è in grado di incrementare i livelli plasmatici di Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) e il numero assoluto di linfociti e neutrofili (52).

Negli ultimi anni, inoltre, è stata descritta un'azione chiave da parte dell'ormone somatotropo sul sistema immunitario, i cui meccanismi sono ancora oscuri (53). Il GH promuove la maturazione e l'attivazione delle cellule dendritiche presentanti l'antigene (54), partecipa alla crescita e sopravvivenza dei linfociti e influenza la produzione di alcune citochine, tra cui l' IFN γ , IL-8, IL-10, IL1-alpha, IL-6 e il TNF-alpha (44,55). Recentemente, è stato dimostrato in linee cellulari linfoidi che la over-espressione dell'ormone della crescita diminuisce la produzione di superossido ed aumenta quella di ossido nitrico mentre le maggiori concentrazioni

di IGF-1 e del suo recettore hanno un' azione anti-apoptotica mediante uno specifico pathway che sembra essere legato alla produzione di BcL-2 (44).

II. OBIETTIVI

Oltre ai noti effetti epatici, il GH ha effetti trascrizionali su altre cellule che sono poco conosciuti. Alcune evidenze suggeriscono che questi effetti trascrizionali possono cooperare con l'IGF-1 nel determinare l'effetto osseo e siano importanti nei soggetti con GHD trattati con rh-GH. Inoltre, la presenza dei GHR in quasi tutti i tipi di cellule rende l'effetto del GH sistemico anche se ancora non ben caratterizzato. Il sistema immunitario è uno degli organi nei quali l'effetto del GH è documentato.

Obiettivo primario di questo studio è determinare l'effetto trascrizionale del GH sui monociti di sangue periferico. Queste cellule sono state scelte perché hanno un'abbondante espressione del GHR e sono facilmente accessibili. Benché la risposta trascrizionale sia tessuto specifica, lo studio degli effetti del GH sui monociti può fornire importanti informazioni e evidenziare differenze esistenti tra soggetti sani e con GHD.

Obiettivo secondario di questo studio è identificare quadri trascrizionali differenziali tra soggetti sani e soggetti con GHD. Per tale motivo, è stata confrontata l'espressione genica di monociti in coltura in condizioni basali e dopo stimolo con GH, di bambini sani e bambini con GHD.

I risultati attesi da questo studio sono:

- L'identificazione di geni la cui espressione è modulata dal GH nei monociti in coltura
- L'identificazione di geni la cui espressione nei monociti è differente tra bambini sani e bambini con GHD
- L'identificazione di geni la cui trascrizione nei monociti è modulata in modo differenziale tra bambini sani e con GHD

I risultati di questo studio potrebbero portare ad individuare un pattern di espressione genica monocitaria che identifichi i bambini con GHD e, quindi, rappresenti un'alternativa ai test di stimolo. Inoltre, uno studio prospettico su bambini GHD trattati con rh-GH potrebbe caratterizzare un pattern di espressione genica monocitaria in grado di predire la risposta alla terapia.

III. PROGRAMMA SPERIMENTALE

Precedenti studi hanno dimostrato che i linfociti di sangue periferico esprimono il GHR e sono, quindi, un potenziale bersaglio di questo ormone (56-58). Nello specifico, sia i linfociti B che i monociti hanno un'espressione particolarmente abbondante di GHR. E' stato documentato che il GHR è presente in più del 90% dei linfociti B e dei monociti, percentuale più variabile nei linfociti T, e che i monociti esprimono all'incirca 6000 recettori per cellula, condizione che persiste anche nei soggetti con GHD (59). Studi precedenti hanno dimostrato che i monociti in coltura rispondono al GH modulando la secrezione di alcune citochine (44,55). Per tali motivi abbiamo deciso di utilizzare una popolazione arricchita di monociti per studiare l'effetto del GH in bambini sani e con GHD. L'effetto trascrizionale del GH è tessuto specifico ma quello nei monociti riflette, seppure in modo parziale, quello di altri tessuti e può fornire importanti informazioni evidenziando differenze esistenti tra soggetti sani e con GHD. I monociti purificati sono stati coltivati in vitro con e senza rh-GH. L'espressione genica è stata studiata analizzando il trascrittoma (*RNA-seq*) mediante *Next Generation Sequencing* (NGS) con la piattaforma *Illumina*.

Lo studio si è sviluppato secondo il seguente protocollo (**Figura 3**):

1. Sono stati selezionati due gruppi di soggetti: bambini di sesso maschile di altezza e velocità di crescita normali e bambini di pari età e sesso affetti da GHD, non in terapia.
2. Sono stati purificati i monociti da sangue periferico per sottrazione con anticorpi monoclonali.

3. Il livello di purezza dei monociti è stato determinato mediante citofluorimetria a flusso laminare e anticorpi specifici.
4. I monociti sono stati coltivati per 24 ore con e senza rh-GH.
5. La responsività al trattamento con rh-GH è stata valutata misurando i livelli di interleuchina 8 (IL-8) nel sovrnatante di coltura.
6. L'RNA totale è stato estratto e congelato fino all'analisi che veniva eseguita contemporaneamente per tutti i punti sperimentali.
7. L'mRNA è stato purificato dall'RNA totale estratto e analizzato mediante piattaforma Illumina.
8. L'espressione differenziale di mRNA è stata analizzata confrontando i monociti di bambini sani e con GHD, stimolati in coltura con rh-GH o non stimolati: GHD non stimolati *vs* sani non stimolati; sani non stimolati *vs* sani stimolati; GHD non stimolati *vs* GHD stimolati; GHD stimolati *vs* sani stimolati.

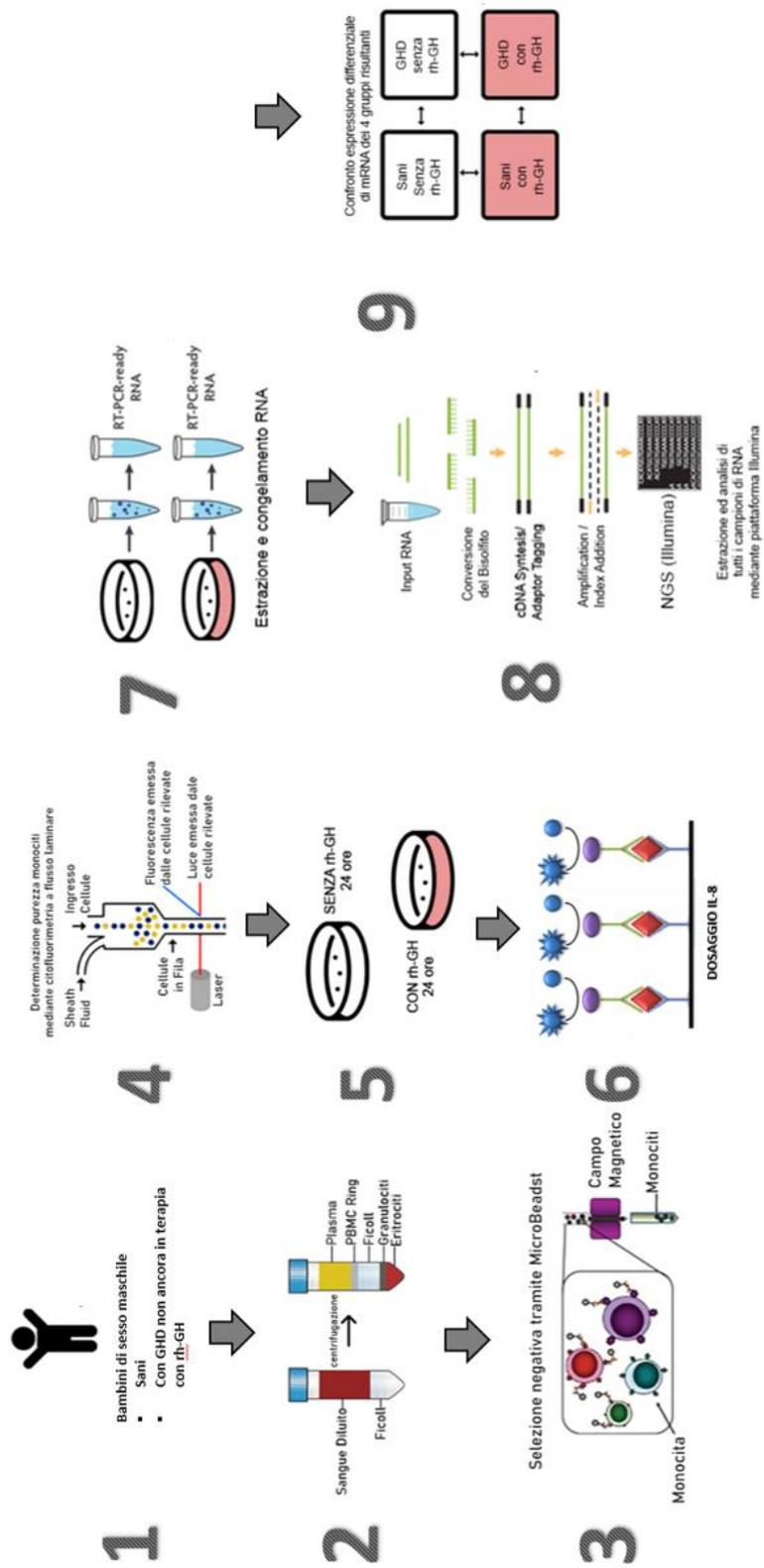


Figura 3: Rappresentazione schematica del protocollo di studio

IV. PAZIENTI, MATERIALI E METODI

4.1 SELEZIONE E ARRUOLAMENTO PAZIENTI

Per questo studio sono stati arruolati complessivamente 12 bambini sani e 12 bambini con GHD reclutati, rispettivamente, presso l'Unità Operativa Complessa di Pediatria e di Endocrinologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona, Università degli Studi di Salerno.

I criteri di inclusione del primo gruppo (pazienti sani, S) e del secondo, gruppo (pazienti con GHD, D) sono stati i seguenti:

GRUPPO S

- Maschi
- Età compresa tra i 5 e i 13 anni
- Nati a termine con peso, lunghezza e circonferenza cranica nella norma
- Altezza e target genetico tra il 25° e il 50° percentile

GRUPPO D

- Maschi
- Età compresa tra i 5 e i 13 anni
- Nati a termine con peso, lunghezza e circonferenza cranica nella norma
- Target genetico tra il 25° e il 50° percentile
- Recente diagnosi di GHD isolato secondo i parametri clinico-auxologici e di laboratorio della Nota AIFA 39 (G.U. 154/2014) e non ancora in trattamento con GH ricombinante

Sono stati esclusi dallo studio, per il gruppo S e per il gruppo D, tutti i soggetti che presentavano le seguenti caratteristiche:

- Altre endocrinopatie diagnosticate in precedenza compreso il Diabete Mellito e tutte le disfunzioni pancreatiche
- Patologie cerebrali, cardiache, toraciche, epatiche, renali o del sistema emolinfopoietico incluse le malattie primarie dell'osso, del tessuto cartilagineo e muscolare
- Malattia celiaca o altre condizioni di malassorbimento cronico e tutte le patologie autoimmuni
- Qualsiasi sindrome genetica (compresa la Sindrome di Turner, di Prader Willi e l'alterazione del gene SHOX)
- Terapie farmacologiche in atto

Per l'ammissione allo studio e seguente valutazione dell'idoneità, tutti i soggetti sono stati sottoposti ad uno screening per la determinazione dei criteri d'inclusione e di esclusione.

In particolare, ai sensi e per gli effetti dell'art.13, primo comma, del D. Lgs.196/03, i dati personali di ogni paziente (iniziali delle generalità, informazioni anagrafiche, dati clinici, e altri dati "sensibili") sono stati registrati, elaborati, gestiti e archiviati in forma cartacea e informatizzata. I genitori (o chi in possesso della tutela legale) dei partecipanti sono stati dettagliatamente informati dello scopo e delle caratteristiche del nostro protocollo mediante una scheda informativa e hanno attestato il loro consenso firmando lo specifico modulo.

Il nostro studio ha avuto parere favorevole dal Comitato Etico-Campania Sud.

4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE DEI MONOCITI

Per ogni bambino è stato eseguito al mattino, a digiuno, un prelievo di sangue di 10 mL raccolto in provette contenenti eparina.

Ogni campione di sangue intero è stato diluito 1:1 con NaCl 0.9% e centrifugato a 400xg, per 30 min a temperatura ambiente (TA) su *Ficoll-Paque* (10 mL) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania) in modo da separare il plasma dalla parte corpuscolata.

Le cellule mononucleate, stratificate nell'interfaccia Ficoll-plasma, sono state raccolte, lavate e centrifugate per quattro volte a 300xg per 10 min a TA con *PBS*, 0.5% *bovine serum albumin (BSA)* e 2 mM di *EDTA*. I linfociti di sangue periferico (PBMC), sono stati risospesi in *PBS* e contati con *camera di Burker*.

I monociti sono stati purificati mediante il kit *Classical Monocyte Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania), al pellet cellulare sono stati aggiunti:

- 30 μ L di Buffer x 10^7 cellule
- 10 μ L di *FcR Blocking Reagent* x 10^7 cellule
- 10 μ L di *Classical Monocyte Biotin-Antibody Cocktail* (cocktail di anticorpi monoclonali biotinilati vs CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 e CD235a) x 10^7 cellule
- 5 μ L di *Thrombocyte Removal Reagent* (Anticorpo monoclonale biotinilato vs CD61) x 10^7 cellule

Dopo incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente, sono stati ancora aggiunti:

- 30 μ L di Buffer x 10^7 cellule

- 60 μ L di *Anti-Biotin MicroBeads* (MicroBeads coniugate ad anticorpo monoclonale anti-biotina) x 10^7 cellule

La sospensione così ottenuta, dopo essere stata nuovamente incubata per 5 minuti a TA, è stata sottoposta a separazione immuno-magnetica mediante l'utilizzo di magneti di tipo *VarioMACS* con apposite *colonne MS (Separation Columns - Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania)*. Questa procedura ha consentito di purificare una popolazione cellulare arricchita in monociti $CD14^+ CD16^-$.

La stima del grado di arricchimento è stata effettuata tramite analisi *citofluorimetrica multiparametrica (FACS)* mediante marcatura con anticorpi monoclonali *CD14-FITC-A* e *CD3-PE-A*.

I monociti di ogni campione sono stati distribuiti in due pozzetti in piastre da 24/well in 1 mL di mezzo *RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Merck KGaA, Darmstadt, Germania)*. Ad uno dei due pozzetti è stato aggiunto rh-GH (*Saizen-Merck Serono, Merck KGaA, Darmstadt, Germania*) al dosaggio di 100 μ g/L e le cellule coltivate poste in incubatore a 37° e 5% di CO₂ per 24 ore.

4.3 TEST ELISA PER LA QUANTIZZAZIONE DELL'IL-8

La concentrazione di interleuchina 8 (IL-8) nel sovrinatante di coltura dei monociti, dopo stimolo per 24 h con rh-GH, è stata misurata mediante test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Il saggio immunoenzimatico è stato eseguito utilizzando il *kit Human IL-8 (Interleukin 8) ELISA* (Elabscience, Cat. E-EL-H6008, Houston, TX, Stati Uniti), basato su metodo indiretto.

1.400.000 monociti sono stati distribuiti in due pozzetti, in piastre da 24/well, in 1 mL di mezzo *RPMI 1640*. Ad uno dei due pozzetti è stato aggiunto rh-GH al dosaggio di 100 µg/L e le cellule coltivate.

Dopo 24 ore, da ogni campione sono stati prelevati 100 µL di surnatante e disposti in pozzetti delle micro piastre in triplicato.

Le densità ottiche sono state misurate mediante *lettore TECAN Infinite 200 Pro* (TECAN, Grödig/Salzburg, Austria) ad una lunghezza d'onda di 450 nm (± 2 nm) e confrontate con i valori di una curva standard costruita in parallelo.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante T-test accoppiato e i risultati sono stati ritenuti significativi per p-value <0.05.

4.4 ESTRAZIONE DELL'RNA

L'RNA totale è stato estratto mediante *TRIZol* o *TRI-REAGENT®* (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania), una soluzione monofasica di guanidina tiocianato e fenolo che lisa la cellula mantenendo integro l'RNA.

Dopo aver allontanato il mezzo di coltura è stato aggiunto TRIZOL (1mL /pozzetto), raccolto dopo diversi passaggi in ago e siringa per completare la lisi cellulare. Successivamente, è stato aggiunto *1-bromo-3-cloropropano* (100 µl/ml di TRIZOL) e dopo aver miscelato mediante *agitatore vortex*, i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 15 minuti, centrifugati a 12000xg per 15 minuti a 4°C.

La fase acquosa, contenente l'RNA, è stata recuperata e precipitata mediante *isopropanolo* (500 µL/mL di TRIZol). Dopo incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, l'RNA è stato precipitato mediante centrifugazione a 12000xg per 10 minuti a 4°C. Il pellet è stato sottoposto a lavaggio con *etanolo al 75%* e risospeso in *H₂O Nuclease free*.

La stima quantitativa e qualitativa dell'RNA totale estratto da ciascun campione è stata effettuata utilizzando lo spettrofotometro *NanoDrop ND-2000c* (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, Stati Uniti), il *Qubit 2.0 fluorometer* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Regno Unito) e lo strumento *Tapestation 4200 secondo il kit Agilent total RNA 6000 Nano* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Stati Uniti).

Il *NanoDrop ND-2000c* è uno spettrofotometro UV-visibile e consente di stimare la concentrazione e la purezza degli acidi nucleici e delle proteine.

Il *Qubit 2.0* è un fluorimetro che permette di perfezionare la stima della concentrazione di DNA, RNA e proteine.

Lo strumento *Agilent 4200 Tapestation system*, fornisce una stima dell'integrità dell'RNA, riportando un *R.I.N. (RNA Integrity Number)* i cui valori variano in una scala da zero (degradazione) a 10 (ottima qualità).

Soltanto i campioni che hanno superato i test di controllo sono stati processati successivamente per l'analisi RNA-Seq.

4.5 RNA-SEQUENCING (RNA-SEQ)

Il trascrittoma, determinato mediante sequenziamento di nuova generazione (*NGS*) dell'RNA (*RNA-Seq*) su piattaforma *Illumina* (Illumina Inc., San Diego, CA, Stati Uniti) e la successiva analisi bioinformatica sono stati condotti presso il Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica dell'Università degli Studi di Salerno.

Per ciascuna delle 4 condizioni sperimentali precedentemente descritte (sano, sano rh-GH, GHD, GHD rh-GH), gli RNA provenienti da 4 campioni con valori di *RIN* simili sono stati uniti in un unico *pool*. Per ogni condizione sono stati quindi prodotti 3 *pool* diversi per un totale di 12 *pool*.

Le librerie sono state sintetizzate a partire da 1 µg di RNA totale per ogni *pool* mediante *TruSeq Stranded Total RNA Library Prep kit (Illumina)* secondo protocollo standard.

In breve, le fasi principali per la preparazione delle librerie prevedono:

1. Rimozione dell'RNA ribosomale (rRNA) con *Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit (Illumina)*
2. Frammentazione enzimatica dell'RNA codificante
3. Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA
4. Legame degli adattatori muniti di *Index* (sequenze univoche per ciascun campione) alle estremità 5' e 3' del cDNA
5. Amplificazione della libreria per PCR.

Le librerie finali così ottenute, con una dimensione media di circa 260 bp, sono state validate attraverso i controlli di qualità alla *Tapestation (Agilent DNA 1000 kit)* e quantizzate al *Qubit* con *DNA HS assay kit*.

Inoltre, sono state diluite ad una concentrazione di 2nM e unite in un unico *pool* di sequenziamento in modo tale che ciascun campione, identificato dal proprio *Index*, fosse presente in quantità equimolare.

Il sequenziamento *NGS* con metodo *Illumina* è stato effettuato in formato 2x75bp in *pair-end* (entrambi i filamenti) ad una concentrazione finale di 1.8 pmol su strumento *NextSeq 500 (Illumina)*.

Con tale sistema, l'amplificazione delle librerie è resa possibile grazie agli adattatori legati alle estremità del cDNA che per complementarità legano gli oligonucleotidi ibridati sulla superficie della *flow-cell* (amplificazione su fase solida). In seguito all'appaiamento cDNA-oligonucleotide, un processo definito

bridge amplification porta alla formazione dei *cluster*, ossia gruppi di migliaia di copie per ciascun frammento di cDNA.

La sequenza di ogni frammento del *cluster* viene poi rivelata incorporando nucleotidi modificati che portano all'estremità 3' un terminatore reversibile di catena e un fluoroforo che, quando eccitato ad una specifica lunghezza d'onda, emette fluorescenza che permette di discriminare tra i diversi nucleotidi. Ad ogni *round* di incorporazione vengono quindi prodotte e acquisite immagini seriali che, una volta processate, permettono di risalire alla sequenza nucleotidica (*reads*) da sottoporre all'analisi bioinformatica.

4.6 ANALISI BIOINFORMATICA E GENE ONTOLOGY

Le *reads* generate dal sequenziamento sono state allineate al genoma umano di riferimento (GRCh38 *Genome Reference Consortium Human Build 38*) utilizzando il programma *STAR 2.7*, con i parametri standard.

È stato, poi, eseguito un controllo qualità dell'analisi di *mapping* utilizzando i programmi *FastQC* e *RSeQC*, in cui sono stati valutati:

- Il tasso di *mapping*
- La percentuale di *reads* che mappano in maniera univoca un *locus*
- La percentuale di *reads* non mappate e la percentuale di *reads* che allineano con introni e regioni intergeniche

In accordo con il *set* di geni presenti su *ENSEMBL*, le *reads* che allineavano su ogni gene sono state contate con *featureCounts*.

L'analisi differenziale è stata eseguita con il pacchetto *DESeq2* (60) su programma *R* utilizzando come cutoff valori di *fold change* (FC) ≤ -1.5 o ≥ 1.5 e di *adjusted p-value* (FDR) ≤ 0.05 applicando il fattore di conversione di *Benjamini-Hochberg*.

Successivamente, abbiamo caratterizzato le funzioni molecolari o dei *pathways* in cui i geni differenzialmente espressi sono coinvolti. L'analisi di arricchimento delle categorie *Gene Ontology (GO)* è stata effettuata utilizzando il software *Ingenuity Pathway Analysis*.

V. RISULTATI

5.1 PAZIENTI ARRUOLATI E CARATTERISTICHE CLINICHE

Sono stati arruolati 12 bambini sani (*Gruppo S*) e 12 bambini con deficit dell'ormone della crescita (*Gruppo D*) con età media di anni $8,1 \pm 3$ e di $8,8 \pm 2,8$, rispettivamente.

Il percentile medio dell'altezza era $39^{\circ},2 (25^{\circ}-50^{\circ}) \pm 21$ per il gruppo S e $1^{\circ} \pm 2,6 (-2,52 \text{ SDS})$ per il gruppo D.

Per i bambini con GHD, la media del picco di GH dopo test di stimolo con Arginina e Clonidina risultava essere $3,6 \pm 2,3$ e $3,7 \pm 2,5$, rispettivamente (**Tabella R1**)

	GRUPPO S	GRUPPO D
PAZIENTI RECLUTATI	12	12
ETA' MEDIA \pm SDS	$8,1 \pm 3$	$8,8 \pm 2,8$
PERCENTILE MEDIO ALTEZZA \pm SDS	$39^{\circ},2 \pm 21$	$1^{\circ} \pm 2,6$
PICCO GH DOPO TEST ARGININA	N.D.	$3,6 \pm 2,3$
PICCO GH DOPO TEST CLONIDINA	N.D.	$3,7 \pm 2,5$

Tabella R1: Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati.

Gruppo S, bambini sani; *gruppo D*, bambini con GHD; *ND*: non determinato

5.2 PURIFICAZIONE MONOCITI

Il procedimento di purificazione dei monociti mediante gradiente e poi sottrazione con anticorpi e biglie magnetiche produceva, a partire da 10 mL di sangue intero, una media di monociti/mL pari a $1,44 \times 10^6 \pm 314 \times 10^3$ per il gruppo S e $1,58 \times 10^6 \pm 356 \times 10^3$ per il gruppo D.

Il grado di arricchimento veniva stimato tramite analisi *citofluorimetrica multiparametrica (FACS)* mediante marcatura con anticorpi monoclonali *CD14-FITC-A* e *CD3-PE-A*.

La **Figura R1** è rappresentativa dell'analisi FACS.

L'analisi FACS dimostrava un'ottima purificazione dei monociti che era in media del $92,4\% \pm 2,8$ per i pazienti sani e del $91,9\% \pm 2,4$ per i bambini con GHD.

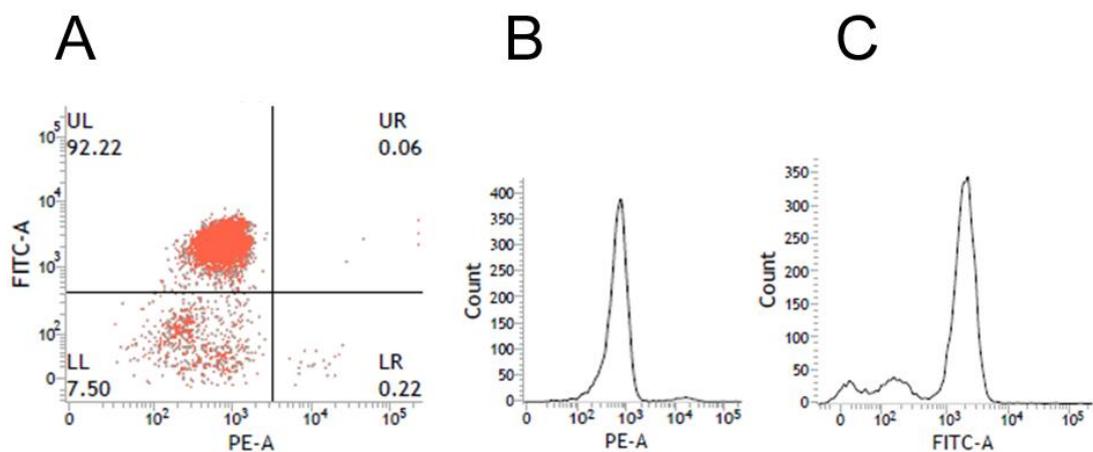


Figura R1: Analisi citofluorimetrica della purificazione dei monociti. La frazione cellulare eluita dalle colonnine di separazione è stata analizzata mediante citofluorimetria a flusso laminare (*FACS*) prima secondo i parametri *SSC* e *FSC* per identificare la frazione corpuscolata e quindi mediante i due anticorpi monoclonali anti-CD14 coniugato a fluoresceina (*FITC-A*) e anti-CD3 coniugato a ficoeritrina (*PE-A*) specifici rispettivamente per i monociti e i leucociti. **A**, grafico a dispersione CD14 vs CD3. I monociti si trovano nel quadrante UL. **B**, espressione CD3; **C**, espressione CD14.

5.3 RISPOSTA DEI MONOCITI AL GH

Settecentomila monociti purificati da due pazienti, uno sano e l'altro con GHD, sono stati coltivati per 24h con 100 µg/L di rh-GH o in sua assenza. Il soprannatante di coltura è stato recuperato e l'IL-8 quantizzata mediante test ELISA. I test hanno evidenziato che le cellule si mantenevano vitali e stimolabili (**Figura R2**). Il livello

di IL-8 in seguito alla stimolazione aumentava in maniera significativa ($p < 0,05$) in entrambi i pazienti e, nello specifico, del 30% nel bambino sano e del 35% nel bambino con GHD

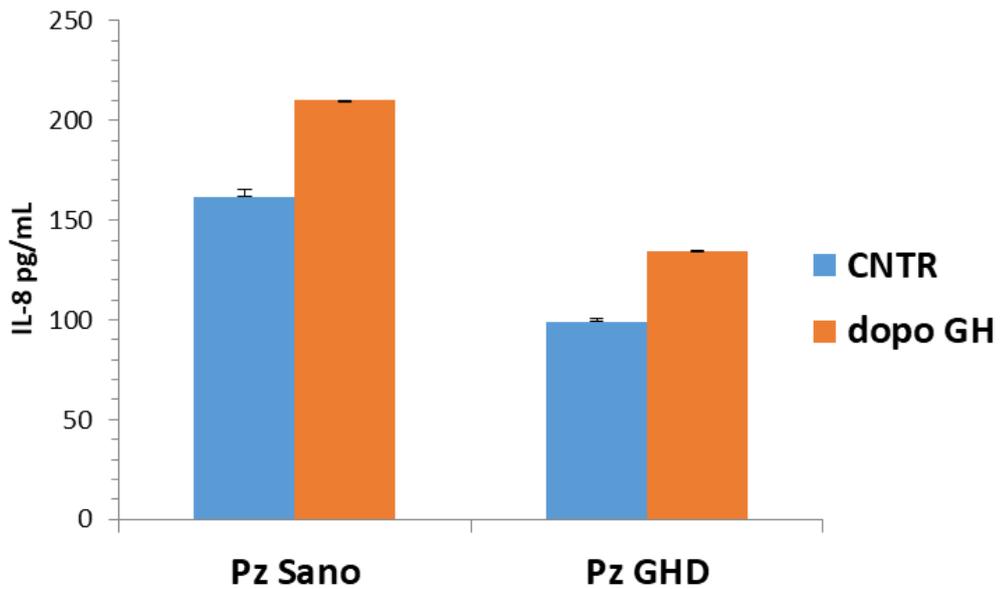


Figura R2: Incremento dei livelli di IL-8 prima e dopo rh-GH nei due campioni, $p < 0,05$

5.4 ANALISI RNA-Seq

Verificati il grado di purezza delle sospensioni di monociti, la loro vitalità e la capacità di rispondere al trattamento con rh-GH in vitro, è stata eseguita l'analisi del trascrittoma.

L'analisi RNA-Seq è stata effettuata in ciascuna delle seguenti 4 condizioni sperimentali:

1. Monociti da paziente sano (*S-CNTR*)
2. Monociti da paziente sano stimolati con rh-GH (*S-GH*)
3. Monociti da paziente con GHD (*D-CNTR*)
4. Monociti da paziente con GHD stimolati con rh-GH (*D-GH*).

Gli RNA provenienti da 4 campioni con valori di *RIN* simili sono stati uniti in un unico *pool*. Per ogni condizione sono stati quindi prodotti 3 *pool* diversi, per un totale di 12 *pool*.

La **Tabella R2** riporta i parametri mediante cui è stata stimata la qualità della libreria sequenziata.

In accordo con le linee guida del progetto ENCODE (*ENCODE Guidelines and Best Practices for RNA-seq: Revised December 2016*), la profondità di sequenziamento identificata dalla seconda colonna (*Reads*) era di circa 40.000.000 *reads paired-end* e si riferisce al numero totale di letture di ciascuna regione genomica.

L'analisi di *mapping* (terza colonna) identifica una percentuale buona di allineamento univoco delle *reads* sul genoma umano di riferimento (*GRCH38*) ed esclude, allo stesso tempo, degradazione del campione poiché la frazione di letture di RNA ribosomiali (ultima colonna) era circa il 2%-20%

Nome campione	Reads	Allineamento Singolo	Allineamento rRNA
Pool 1	32.104.742	68.59%	19.40%
Pool 2	29.028.736	80.73%	4.61%
Pool 3	24.772.352	72.86%	14.03%
Pool 4	34.339.822	79.23%	6.50%
Pool 5	41.234.212	83.02%	2.78%
Pool 6	34.583.172	80.56%	3.21%
Pool 7	30.698.790	68.57%	14.92%
Pool 8	36.993.410	73.91%	11.85%
Pool 9	30.873.656	76.08%	6.86%
Pool 10	24.169.440	72.67%	7.55%
Pool 11	25.395.172	78.22%	4.6%
Pool 12	34.343.044	68.79%	18.52%

Tabella R2: parametri utilizzati per il controllo qualità della libreria sequenziata

5.5 ESPRESSIONE GENICA DIFFERENZIALE TRA MONOCITI DI BAMBINI SANI E CON DEFICIT DI GH

L'analisi di espressione genica differenziale tra i vari punti sperimentali veniva eseguita con *DESeq2*. Tramite questa analisi venivano identificati quei geni che, nel confronto tra i gruppi, avevano valori di *fold change* (FC) ≤ -1.5 o ≥ 1.5 e di *adjusted p-value* (*FDR* o *padj*) ≤ 0.05 . L'analisi tra i gruppi *D-CNTR* e *S-CNTR* ha individuato **58 geni** con espressione differenziale (**Figura R3**), **33 sovra-regolati** ($FC \geq 1.5$), **20 sotto-regolati** ($FC \leq -1.5$) (**Tabella R3**).

Gene	padj	FC	Gene	padj	FC
PF4V1	0,00002	10,29	MYCL	0,02437	1,58
RPL10P6	0,00020	24,91	ZMIZ1-AS1	0,04393	-3,95
HLA-C	0,00810	3,2	HERC2P2	0,03933	1,51
HGD	0,01989	5,48	SLC22A15	0,00969	-1,69
BUB1	0,00388	-2,9	TRAF1	0,00030	1,86
ANTXR1	0,04393	3,06	OST4	0,01782	1,62
CHST2	0,04599	1,89	JAML	0,01556	1,36
TSPAN33	0,02581	1,59	SLC38A6	0,04599	-1,62
HNRNPH3	0,01614	-2,05	CCR2	0,00709	1,41
CDK6	0,02437	-1,63	MTUS1	0,00316	-6,08
MT-ND4	0,01782	-1,83	CCDC144A	0,01430	-2,03
HLA-A	0,00002	3,23	PALD1	0,02573	1,55
HNRNPA2B1	0,04599	-1,46	EMP1	0,00316	-2,02
MRC1	0,02437	-1,76	SNAI1	0,04393	1,91
SNAPC3	0,02437	-1,57	CCR7	0,00125	2,9
LINC00989	0,03130	3,08	RFTN1	0,01556	1,64
VMO1	0,0000000003	4,75	FCGR2B	0,00384	1,71
CAVIN2	0,02695	2,16	CCL22	0,01121	2,29
C3	0,00002	1,7	VAT1	0,00252	-2,25
TMSB4X	0,02573	1,36	TVP23A	0,02518	3,47
MT-CO1	0,00252	-1,5	MT-ND3	0,04092	-2,33
EVI2B	0,00290	-1,85	A2M	0,01430	1,6
ADGRD1	0,04393	1,63	KCNMA1	0,0000000001	-7,4
PF4	0,00203	2,33	RAMP1	0,03128	3,12
DUSP5	0,04393	1,78	PKIB	0,01089	2,24
MT-CO2	0,02573	-1,65	FCER1A	0,04393	1,73
RPL10P9	0,00069	5,56	AQP9	0,00969	-2,82
FCN1	0,04393	1,5	CLEC4F	0,03280	2,97
SLC25A19	0,04599	1,46	ADAMTS2	0,00069	-14,61

Tabella R3: Geni espressi in modo differenziale tra il gruppo con GHD (*D-CNTR*) e quello sano (*S-CNTR*) non trattati con rh-GH. *Padj*, *adjusted p-value*

Tra i geni modulati, sono da evidenziare alcuni fortemente sovraespressi (*HLA-A*, *HLA-C*, *CCR7*) ricollegabili alla maturazione dendritica dei monociti, essenziali per la trasformazione del monocita in cellula presentante l'antigene.

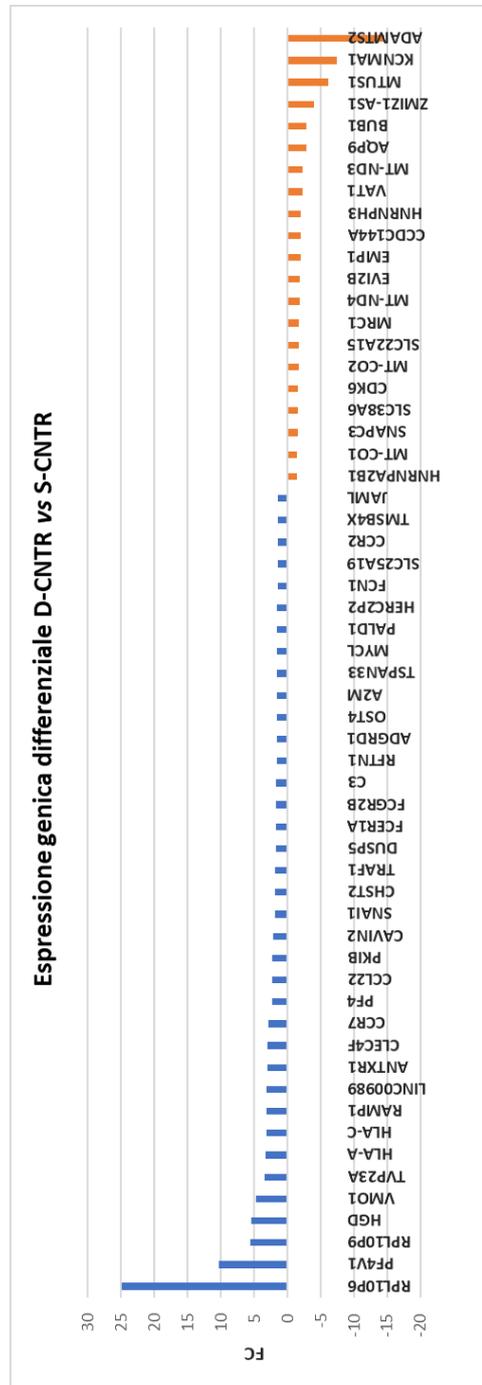


Figura R3: Espressione genica differenziale tra monociti di bambini con GHD (*D-CNTR*) e bambini sani (*S-CNTR*); FC, fold change

5.6 ESPRESSIONE GENICA DIFFERENZIALE INDOTTA DAL GH NEI MONOCITI

L'effetto trascrizionale del GH sui monociti in vitro veniva valutato confrontando l'espressione genica dei monociti di bambini sani e con GHD prima e dopo 24 ore di stimolazione. Questa analisi non evidenziava nessun gene la cui trascrizione fosse aumentata o diminuita dal GH almeno 1.5 volte e con una significatività statistica $FDR \leq 0,05$.

Ipotizzando che l'effetto modulatore del GH fosse oscurato da un limite di significatività troppo basso per una numerosità di campioni ridotta, abbiamo tenuto conto solo dei valori di $FC \leq -1.5$ e ≥ 1.5 tra i due gruppi prima e dopo stimolo con rh-GH. Omettendo la correzione statistica di Benjamini-Hochberg e lasciando solo come limite un $p \leq 0.05$ al test T-Student, **23 geni** risultavano modulati dal GH nei monociti di bambini sani (**17 sovra-regolati, 6 sotto-regolati**) (**Tabella R4 A**) e **4 geni** nei monociti di bambini con GHD (**1 sovra-regolato, 3 sotto-regolati**) (**Tabella R4 B**).

TABELLA R4 A	
GENE	FC S-CNTR Vs S-GH
SPINK1	1,95
APOC1	1,78
IL4I1	1,67
MMP9	1,95
ADAMTS2	1,65
SLAMF8	1,51
P2RY12	-1,8
AQP9	1,55
SLC1A3	1,6
OPTN	1,64
CR1	1,52
PLXNA1	1,5
BHLHE41	1,82
NOTCH3	1,87
RAMP1	-1,51
CYP27A1	1,71
RPL10P6	1,98
HLA-C	1,6
CLEC4F	-1,84
CCDC68	-1,72
FBP1	1,54
ENKUR	-1,84
LINC01539	-2,29

TABELLA R4 B	
GENE	FC D-CNTR Vs D- GH
SPINK1	-7,49
CDA	-1,6
RPS16	-1,51
TMEM150C	1,62

Tabella R4: Espressione genica differenziale indotta dal GH. Monociti di bambini sani (*S-CNTR*) o con GHD (*D-CNTR*) venivano trattati per 24 ore con rh-GH (*S-GH* e *D-GH* rispettivamente). Gli RNA-seq delle condizioni “controllo” e “trattamento” venivano confrontati. A, gruppo Sani; B, gruppo con GHD.

5.7 ESPRESSIONE GENICA DIFFERENZIALE TRA MONOCITI DI BAMBINI SANI E CON DEFICIT DEL GH, STIMOLATI CON GH IN COLTURA

L’analisi differenziale tra i gruppi *D-GH* e *S-GH* e ha individuato **150 geni** con espressione differenziale, **71 sovra-regolati**, **62 sotto-regolati** (Tabella R5, Figura R4).

Tra i 150 trascritti, alcuni avevano espressione differenziale anche tra i vari punti sperimentali precedentemente analizzati.

Nello specifico, i geni differenzialmente espressi in comune (**Tabella R5**) erano:

- **45** con il punto sperimentale *D-CNTR vs S-CNTR*
- **22** con il punto sperimentale *S-CNTR vs S-GH*
- **4** con il punto sperimentale *D-CNTR vs D-GH*

Tra questi, **5 geni** avevano espressione differenziale sia tra i gruppi *D-CNTR vs S-CNTR* che tra *S-CNTR vs S-GH* (**Tabella R5**) mentre **un solo gene**, invece, risultava differenzialmente espresso tra i gruppi *S-CNTR vs S-GH* e *D-CNTR vs D-GH* (**Tabella R5**).

Gene	padj	FC	Gene	padj	FC	Gene	padj	FC
PF4V1	0,00165	5,15	OST4	0,00166	1,69	CCR7	0,00003	3,28
RPL10P6	0,00001	12,83	JAML	0,00054	1,42	CXCR2P1	0,00591	1,97
HLA-A	0,00008	2,84	CALU	0,02664	-1,42	S100A11	0,02651	-1,71
LINC00989	0,02919	2,78	DYSF	0,01859	-2,32	RFTN1	0,00006	1,87
VMO1	5,41E-11	4,4	SLC38A6	0,00591	-1,7	RALB	0,02922	-1,53
CAVIN2	0,03012	2,02	CCR2	0,00014	1,48	LINC00926	0,00567	-2,3
C3	0,00013	1,59	MTUS1	0,00106	-6,42	SH3BGRL3	0,01282	-1,53
MT-CO1	0,00530	-1,43	CD207	0,01973	7,1	CLEC10A	0,00591	1,86
EVI2B	0,00299	-1,77	LAT2	0,01596	1,37	ATP2A3	0,00206	-1,99
ADGRD1	0,04469	1,56	DAPP1	0,03414	1,53	FCGR2B	0,00001	1,98
PF4	0,00084	2,26	TEX2	0,01973	-1,46	ADORA3	0,01282	1,64
DUSP5	0,02922	1,73	RTN3	0,00812	-1,45	PALLD	0,04782	1,83
MT-CO2	0,02318	-1,61	CD300LB	0,00397	1,78	ABHD2	0,00001	-1,6
RPL10P9	0,00010	5,45	HSPA7	0,00378	1,82	VAMP8	0,03818	-1,72
FCN1	0,02676	1,48	CCDC144A	0,00082	-2,2	CCL22	0,00008	2,72
CD83	0,04308	1,67	GPR132	0,04308	1,49	CD93	0,00082	1,78
SLC25A19	0,02426	1,45	NBPF1	0,03724	-1,65	ENOX1	0,03161	2,9
MYCL	0,00812	1,58	CSGALNACT2	0,03856	-1,74	FCGR2C	0,00130	1,6
SERPINF1	0,03621	1,68	CASP1	0,03407	1,38	SDCBP	0,00201	-1,77
ZMIZ1-AS1	0,01269	-3,98	ANXA4	0,03619	-1,58	CD244	0,00104	2,04
HERC2P2	0,00794	1,53	PALD1	0,00017	1,74	DMXL2	0,02506	-1,39
SLC22A15	0,00130	-1,74	EMP1	0,00003	-2,27	SNAP29	0,02676	-1,59
TRAF1	0,00001	1,93	IRF4	0,00455	1,53	ITGA4	0,00794	1,41
ME1	0,02318	-1,61	SNAI1	0,00166	2,15	JAKMIP2	0,01192	-2,08
MGST1	0,04569	-1,76	GPAT3	0,03300	1,75	HSD3B7	0,03457	-2,28

Gene	padj	FC	Gene	padj	FC	Gene	padj	FC
FCGR1A	0,03457	-2,44	SPG21	0,01029	-1,42	LAD1	0,00082	3,92
VAT1	4,58E-06	-2,75	KCNMA1	1,33E-15	-9,56	LAMP3	0,00010	3,36
EHF	0,01329	2,31	TRAF3IP3	0,02319	1,56	NCCRP1	0,00277	4,94
CTTNBP2	0,04455	1,58	VCAN	0,00812	1,7	PLXNA1	0,00130	-2,09
TFRC	0,00010	-2,01	ACP5	0,02319	-1,8	CDA	0,01282	-2,94
CYBB	0,00023	-1,46	NCEH1	0,00043	-1,69	NR1H3	0,03856	-2,25
TVP23A	0,00043	4,26	ZC3H12C	0,00078	-1,72	DSG2	0,00014	4,23
CARD16	0,02319	1,67	MYOF	0,00868	-1,92	TMEM150C	0,03384	7,82
MS4A6A	0,03681	1,34	FBP1	0,00542	-2,39	CR1	0,04455	-2,54
FKBP5	0,00378	-1,86	DRAM1	0,01298	-1,61	CYP27A1	0,00009	-2,31
RPS16	0,00455	-2,92	SLC35E3	0,02633	-1,61	SLAMF8	1,64E-07	-2,67
ETV3	0,01676	1,56	RAMP1	0,00026	4,33	AQP9	2,25E-08	-5,28
MT-ND3	0,00067	-2,89	PKIB	2,92E-06	3,11	SLC1A3	4,81E-07	-2,67
NRG1	0,00191	2,19	TP53I11	0,00806	-2,3	CCDC68	0,04569	4
PRKCSH	0,02108	-1,47	FTH1	0,00388	-1,85	OPTN	0,02260	-2,11
MITF	0,00006	-1,67	SLCO5A1	0,00067	2,5	BHLHE41	0,00005	-3,15
SCCPDH	0,01693	-1,93	AOC1	0,00017	3,88	CLEC4F	1,11E-06	6,02
CSTB	0,00299	-1,87	FCER1A	4,52E-07	2,51	NOTCH3	0,04950	-3,43
HOMER2	0,00013	2,33	P2RY12	0,01051	5,1	ADAMTS2	4,76E-06	-30,84
MEF2C	0,04735	1,52	PLA2G7	0,00166	-1,74	ENKUR	0,01596	3,89
VNN1	0,01451	1,98	RGS18	0,00003	2,51	IL4I1	0,02900	-2,56
SULF2	0,00001	1,69	ITIH1	0,04541	2,59	APOC1	0,04952	-4,14
LRP5	0,00332	1,86	PDE5A	0,00054	2,75	MMP9	0,01638	-3,3
A2M	1,64E-07	2,06	PLD4	0,00001	2,85	LINC01539	0,01192	8,01
RAB13	0,00678	-2,27	HEMGN	0,00065	4,64	SPINK1	0,00547	-34,26

Tabella R5: Geni espressi in modo differenziale tra il gruppo *D-GH* e quello *S-GH*



Come nei monociti di bambini con GHD, anche nei monociti di bambini GHD stimolati con rh-GH alcuni geni (*HLA-A*, *CCR7*), ricollegabili alla maturazione dendritica, risultavano fortemente sovraespressi in confronto ai monociti di bambini sani stimolati con rh-GH.

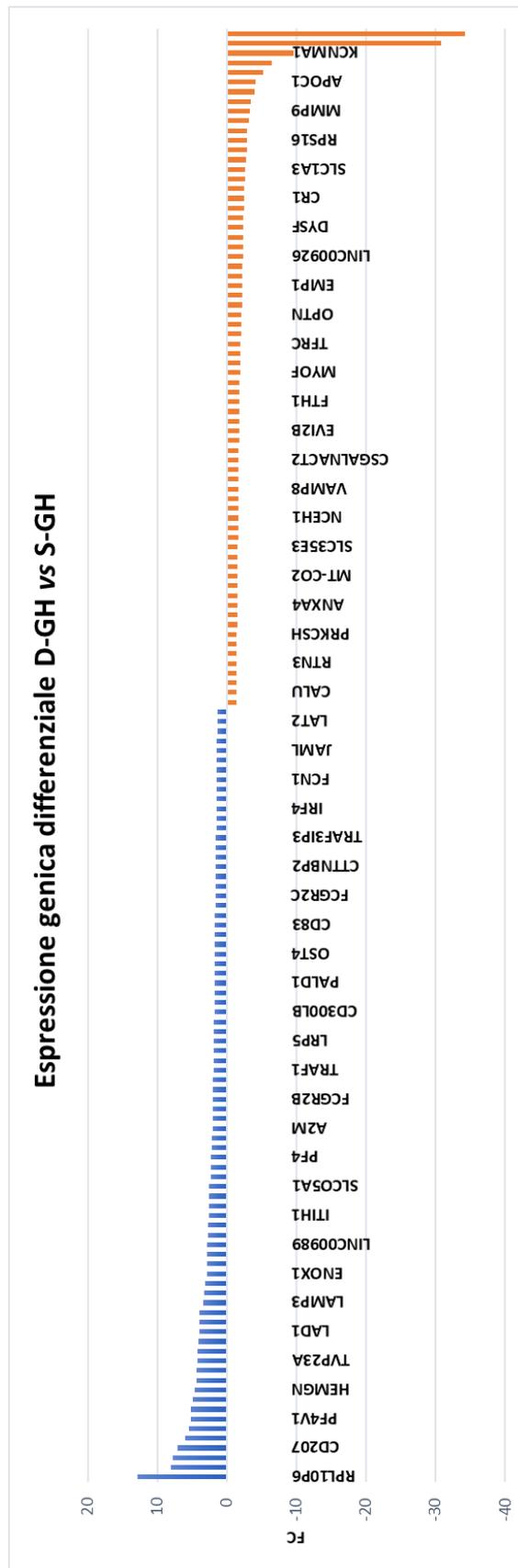


Figura R4: Espressione genica differenziale tra monociti di bambini con GHD e sani, stimolati con rh-GH

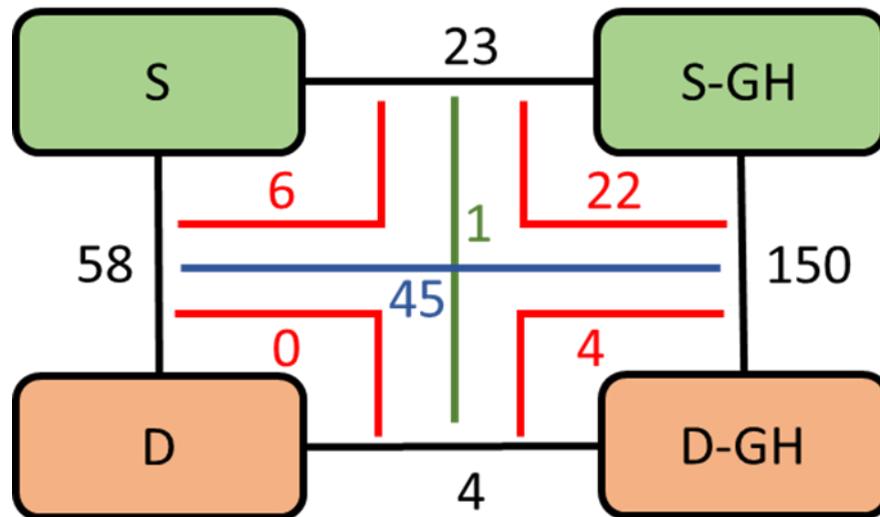


Figura R5. Sinopsi dell'espressione differenziale tra i punti sperimentali. I numeri neri si riferiscono al numero di geni espressi differenzialmente, i numeri rossi si riferiscono ai geni in comune. *S*, monociti di bambini sani; *D*, monociti di bambini GHD; *-GH*, monociti S e D coltivati per 24h con rh-GH

VI. DISCUSSIONE

Evidenze sperimentali propongono per il GH un ruolo non solo attraverso l'IGF-1 ma anche mediante azione diretta su diversi tessuti bersaglio. Oltre ai già noti effetti metabolici sull'omeostasi glicidica nel fegato, è stato prospettato un effetto dell'ormone somatotropo su altri organi tra i quali il sistema immune e l'osso, direttamente attraverso i suoi recettori o modulando l'azione dell'IGF-1. In conseguenza di ciò, le cellule dei diversi distretti corporei di bambini affetti da deficit somatotropo subiscono una ridotta stimolazione sia diretta che indiretta, rispetto ai bambini sani. Con la terapia sostitutiva mediante GH ricombinante, queste stesse cellule vanno incontro poi a una intensa e prolungata stimolazione che determina crescita ossea ed effetti metabolici. Sulla base di questo razionale, mi sono proposta di determinare l'effetto trascrizionale diretto e indiretto del GH *in vivo* su cellule linfoidi e diretto sulle stesse cellule in coltura. L'effetto trascrizionale del GH è tessuto specifico. Ho scelto di utilizzare come modello i monociti che, seppure in modo parziale, può riflettere quello di altri tessuti. Le cellule monocitarie, inoltre, costituiscono la popolazione più omogenea tra quelle leucocitarie, esprimono un notevole numero di GHR sulla propria superficie cellulare, su di essi è documentata una risposta diretta al GH, e sono facilmente reperibili dal sangue periferico mediante procedure di arricchimento già protocollate. Lo strumento scelto per analizzare gli effetti trascrizionali del GH è stato la NGS con l'analisi differenziale dell'RNA-seq attraverso le procedure più aggiornate di analisi bioinformatica. Il confronto tra i monociti di bambini sani e bambini con GHD ci ha fornito l'effetto trascrizionale del GH *in vivo*, diretto o mediato dall'IGF-1 e da altri eventuali fattori. Il confronto tra i monociti di bambini sani e bambini con GHD, stimolati in coltura con rh-GH ci ha dato indicazioni sull'azione diretta del GH su queste stesse cellule.

Per questo studio sono stati arruolati 12 bambini sani e 12 bambini con deficit dell'ormone della crescita. I due campioni, (gruppo *sano* e con *GHD*) si presentavano *omogenei* per numero e per caratteristiche fenotipiche e anamnestiche e pertanto erano confrontabili.

Il procedimento di isolamento dei monociti mediante gradiente e poi sottrazione con anticorpi e biglie magnetiche produceva una media di monociti in linea con i parametri di riferimento riportati in letteratura e ottimali per praticare l'analisi RNA-seq (61).

Nel sangue periferico sono presenti due sottopopolazioni specifiche identificabili per la presenza, sulla superficie cellulare, di due antigeni differenti:

- *Monociti classici CD14⁺/CD16⁻* con alta espressione di CD14 e assente di CD16
- *Monociti non classici CD14 low/CD16⁺* con alta espressione di CD16 e minore di CD14.

I primi rappresentano il 90-95 % dell'intera popolazione monocitaria, i secondi solo il 5-10% (62).

I monociti circolanti vengono rilasciati dal midollo osseo nel circolo sanguigno dove hanno un'emivita di circa 8-9 ore prima di migrare verso siti e tessuti infiammatori e differenziarsi in *macrofagi residenti* o in *cellule dendritiche* che cooperano, assieme ai neutrofili e altri leucociti polimorfonucleati, ai meccanismi di difesa che costituiscono l'*immunità innata* (61). L'isolamento delle cellule monocitarie, quindi, ha il potenziale di consentirne lo studio prima della loro attivazione. La *separazione immunomagnetica* per sottrazione è da considerarsi la metodica di prima scelta perché capace di purificare una popolazione cellulare arricchita in monociti CD14⁺ CD16⁻ senza attivarli (61). Il grado di arricchimento,

stimato tramite analisi *citofluorimetrica multiparametrica (FACS)* con anticorpi monoclonali *CD14-FITC-A* e *CD3-PE-A*, è da considerarsi *ottimo* per valori superiori o uguali al 90% (61). In linea con la letteratura, in questo studio, l'isolamento dei monociti veniva effettuato mediante *tecnologia microbeads* e l'analisi FACS praticata dimostrava un'ottima purificazione che era in media del 92,4% $\pm 2,8$ per i pazienti sani e del 91,9% $\pm 2,4$ per i bambini con GHD.

Studi precedenti suggeriscono una complessa interazione tra sistema neuroendocrino ed immunitario (63). I leucociti hanno sulla propria superficie i recettori per l'IGF-1 e per il GH (59), membro, quest'ultimo, della famiglia dei recettori delle citochine tipo I (IL-2R, IL-4R e IL-6R), che consentono a questi due ormoni, di esercitare un effetto sulla risposta cellulo-mediata e umorale (59,64).

Le citochine sono una famiglia di *proteine mediatrici* a cui appartengono le interleuchine (IL), il fattore stimolante le colonie (CSF), l'interferone (IFN), il fattore di necrosi tumorale (TNF) ed altri fattori di crescita (63). Agiscono regolando lo sviluppo del sistema ematopoietico e possono influenzare la sopravvivenza, la proliferazione, la differenziazione e l'emostasi di tutte le cellule linfoidi (65). Un numero considerevole di studi ha dimostrato l'effetto modulatorio dell'ormone somatotropo sulla sintesi e secrezione delle citochine (63). Nello specifico, alcuni autori hanno riportato che il GH è in grado di incrementare, in maniera dose-dipendente, la produzione di IFN- γ in colture di PBMC provenienti da soggetti sani (66). Altri studi, inoltre, hanno descritto l'aumento dei livelli, in vivo, di TNF- α , IL-1, IL-2, IL-12 e IFN- γ , 4 ore dopo la somministrazione di rh-GH (67); altri, ancora, l'incremento della secrezione di IL-1 α , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17 quando il GH ricombinante veniva aggiunto a colture di monociti in vitro (44,55). Un altro lavoro, invece, ha dimostrato che la secrezione *in vitro* spontanea e/o mitogeno indotta, di citochine infiammatorie da parte di colture di PBMC era

più bassa nel paziente con GHD rispetto al controllo sano (63). Questa letteratura è ampia ma spesso contraddittoria e, ad oggi, non è chiaro quali siano gli effetti del GH sul sistema immune e se i soggetti con GHD abbiano un diverso assetto immunologico.

Nel nostro studio, monociti purificati da due pazienti, uno sano e l'altro con deficit dell'ormone somatotropo, sono stati coltivati per 24h con 100 µg/L di rh-GH o in sua assenza e l'IL-8 quantizzata dal soprannatante di coltura mediante test ELISA. In linea con i dati riportati in letteratura, i test hanno evidenziato che il livello di IL-8, in seguito alla stimolazione, aumentava in maniera significativa in entrambi i pazienti, indice di vitalità e stimolabilità delle colture monocitarie e, inoltre, ancora in accordo con quanto descritto dagli autori, la sua concentrazione sia basale che dopo stimolo si manteneva più bassa nel bambino con GHD rispetto al paziente sano.

Quale sia il meccanismo, se trascrizionale o post-trascrizionale e se diretto o mediato dall'IGF-1 o da altri fattori, alla base dei differenti livelli di citochine tra pazienti sani e con deficit di GH, non è, ad oggi, ancora conosciuto; meccanismo complicato dal fatto che sia l'ormone somatotropo che l'IGF-1 sono entrambi sintetizzati anche dalle cellule del sistema immunitario (64).

La nostra analisi sul trascrittoma non ha evidenziato variazioni significative dei livelli di trascrizione di nessuna di queste citochine.

Per quanto riguarda l'IL-8, l'espressione di mRNA nei monociti di bambini con deficit di GH è inferiore a quella dei bambini sani, seppur con una differenza non significativa. Né tantomeno abbiamo osservato differenze di trascrizione nei monociti stimolati in coltura con rh-GH. Un'analisi più complessiva evidenzia, però, un effetto trascrizionale a sostegno della modulazione del segnale cellulare dell'IL-8. L'analisi dei pathways biologici regolati dai geni differenzialmente

espressi eseguita mediante l'applicazione software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), evidenzia una riduzione complessiva del pathway funzionale dell'IL-8 (**Figura D1**) in seguito a stimolazione dei monociti di bambini con deficit di GH. L'analisi con lo strumento IPA, inoltre, evidenzia un deciso aumento dei pathways *Nuclear factor of activated T cells* (NFAT) (**Figura D1, D2A**) e di *maturazione delle cellule dendritiche* (**Figura D1, D2B**), nei monociti di bambini con deficit di GH rispetto a quelli di bambini sani e un aumento ancora maggiore dopo stimolazione in coltura con rh-GH.

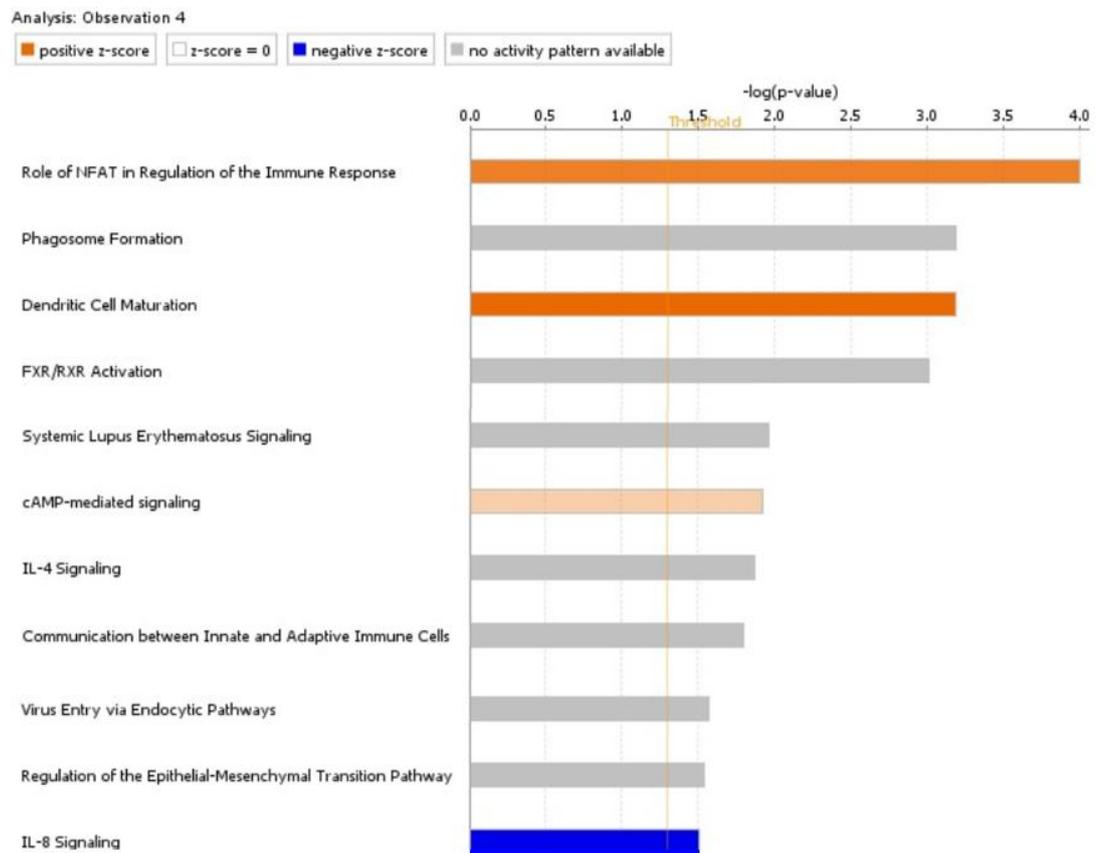


Figura D1: Analisi dei pathway biologici regolati dai geni differenzialmente espressi nei monociti di bambini con deficit di GH rispetto ai monociti di bambini sani, dopo stimolazione in coltura con GH ricombinante; l'analisi è stata eseguita mediante l'applicazione software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA); la banda arancione è indice di attivazione del pathway, la banda blu di riduzione, quella grigia che il software ha rilevato una modulazione significativa dei geni coinvolti senza poter discriminare tra attivazione o riduzione del pathway. La stringa $\log(p\text{-value})$ indica la significatività dei risultati elaborati dal software e si esprime con un valore soglia (*threshold*) compreso tra 0.0 (nessuna significatività) e 4.0 (massima significatività).

Fig. D2A

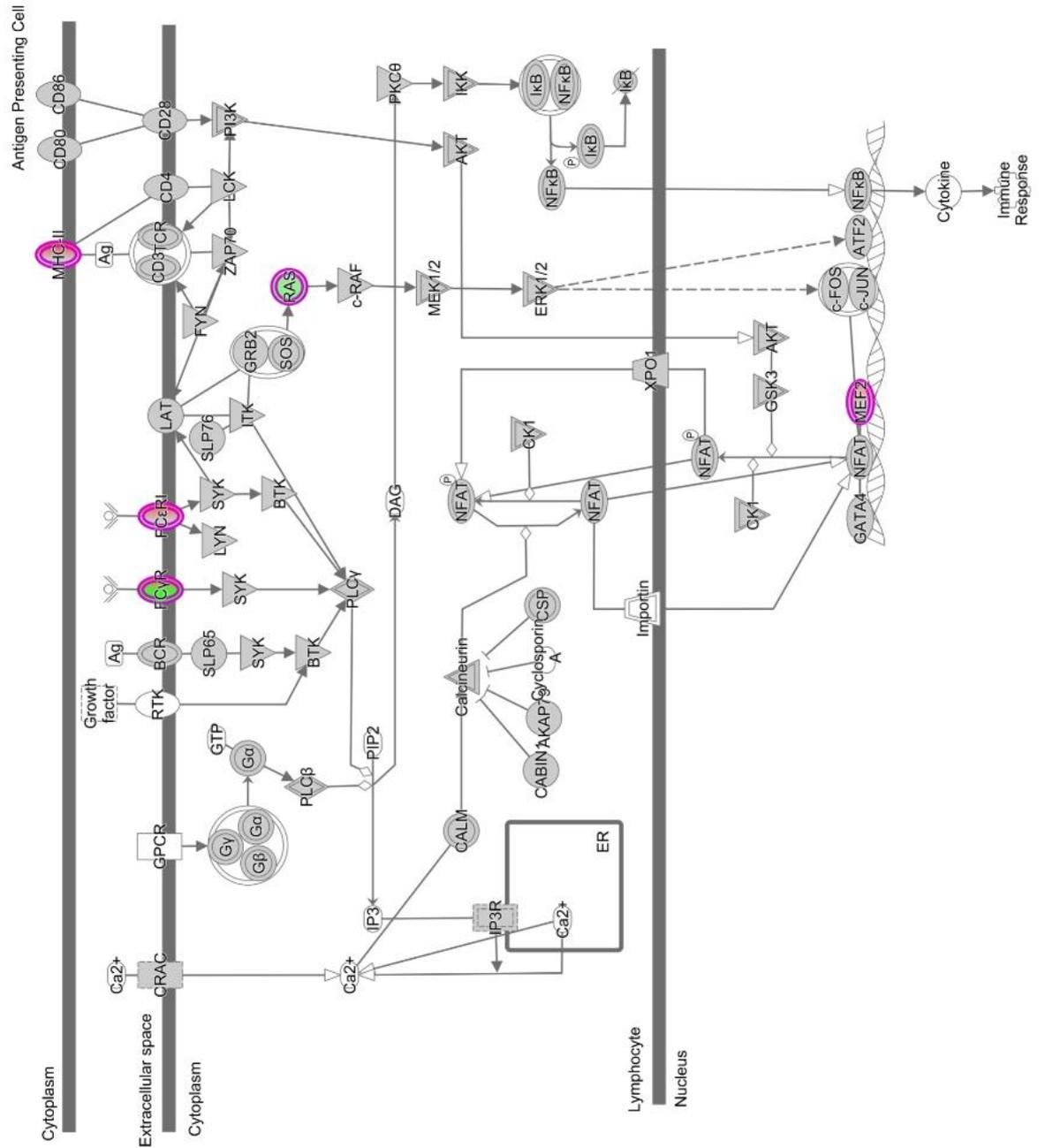


Fig. D2C



Figura D2: Rappresentazione schematica di pathways analizzati mediante l'applicazione software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA);

A, ruolo di *NFAT* nella regolazione della risposta immune; **B**, maturazione e attivazione della cellula dendritica durante la risposta cellulo-mediata; **C**, legenda di predizione dell'attività dei singoli geni coinvolti in uno specifico pathway analizzato mediante software IPA. Il grado di attività genica è correlato a una scala cromatica.

I membri della famiglia NFAT sono fattori di trascrizione cruciali che controllano l'espressione di citochine proinfiammatorie dell'immunità nei linfociti T e B (68). Il ruolo di NFAT è dimostrato tanto nella risposta immunitaria bersaglio-specifica quanto in quella innata. Dati recenti hanno rivelato importanti ruoli della famiglia NFAT nelle cellule dendritiche e nei macrofagi, che insieme cooperano per avviare, modellare e mantenere le risposte immunitarie protettive ai patogeni (69). L'effetto anti-rigetto e immunosoppressore della ciclosporina, del tacrolimus e in genere degli inibitori della calcineurina, associato ad una riduzione delle difese immunitarie verso i patogeni, è in parte dovuto alla mancata attivazione di NFAT (70).

Anche le cellule dendritiche (DCs), come la famiglia NFAT, svolgono un ruolo chiave nella iniziazione e regolazione della risposta immunitaria (71). Assieme ai macrofagi e ai linfociti B, sono importanti cellule presentanti l'antigene (APCs) e sono in grado di creare una rete sentinella capace di rilevare, catturare e processare antigeni rilasciati da agenti virali o batterici o provenienti da tessuti danneggiati durante un processo infiammatorio (72). La fase più importante della vita biologica di una cellula dendritica è la sua *attivazione o maturazione* (73), un complesso processo che ha inizio durante un'infezione o un insulto infiammatorio ed è caratterizzato dall'acquisizione della capacità di presentare e processare l'antigene (74). Una volta attivate, le DCs esprimono sulla propria superficie, le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe 2 (MHC, class II) assieme a molecole co-stimolatorie come il recettore *CCR7* (Chemokine Receptor 7) (73). L'analisi qui effettuata ha evidenziato un notevole aumento dell'espressione di HLA-A e HLA-C (FC 3.2), e soprattutto di *CCR7* nei monociti di bambini con GHD (FC 2.9), e ancora un più notevole aumento nei monociti di bambini con GHD dopo stimolazione con rh-GH rispetto ai monociti di bambini sani (FC 3.28).

L'aumento della trascrizione del gene CCR7 nei monociti di bambini con GHD, sia basale che dopo stimolo in coltura con rh-GH, è in favore di un'azione indiretta del GH *in vivo*.

La complessità del sistema immunitario e la molteplicità delle relazioni tra le sue componenti cellulari, rende difficile predire se l'aumento dell'espressione di CCR7 nei monociti dei bambini con GHD e in generale se l'aumento dell'attività dendritica abbia effetti clinici. Topi *knock-down* per CCR7 sviluppano autoimmunità, mentre l'aumentata espressione di CCR7 induce tolleranza immunitaria (75,76).

Alcuni lavori ipotizzano che un eccesso dell'attività dendritica documentata da un aumento dell'espressione di CCR7 abbia come conseguenza un eccesso di risposta infiammatoria. Un esempio è la febbre emorragica di Dengue che si associa ad un aumento dell'espressione monocitaria di CCR7 e nella quale trovano applicazione farmaci che inibiscono la maturazione dendritica attraverso la riduzione dell'espressione di CCR7 (77,78).

In definitiva, l'aumento dell'attività dendritica testimoniata dall'aumento trascrizionale di CCR7, HLA-A, HLA-C e del pathway di NFAT dovrebbe corrispondere ad uno stato di maggiore immunoreattività, cosa che si riscontra nei soggetti con GHD nei quali è documentato un aumento degli indici infiammatori quali TNF α , PCR, fibrinogeno, IL-6 (79,80).

Questi risultati suggeriscono di valutare più approfonditamente lo stato pro-infiammatorio nei bambini con deficit del GH.

La diagnosi di deficit di GH durante l'età evolutiva si basa classicamente sulla valutazione clinica associata ad indagini radiologiche e laboratoristiche (17). Quest'ultime, si basano sull'esecuzione di test di stimolo della secrezione di GH che, sebbene rappresentino il *gold standard* per la diagnosi di deficit, presentano

scarsa riproducibilità e accuratezza e sono caratterizzati da un numero considerevole di falsi positivi e talvolta negativi (1).

Recentemente, alcuni autori hanno confrontato l'espressione genica di una coorte di bambini affetti da deficit di GH e non ancora in trattamento con un gruppo di controllo i cui dati auxologici sono stati acquisiti da dataset disponibili online (81). Il lavoro si poneva, tra gli obiettivi primari, quello di definire uno specifico pattern genetico da correlare al picco di GH dopo test di stimolo; i geni individuati, quindi, avrebbero potuto rappresentato un nuovo strumento diagnostico del deficit di GH superando, così, il limite dei test di provocazione (81).

Questo lavoro è certamente innovativo ma, anche per stessa ammissione degli autori, presenta alcune criticità. I profili di espressione genica venivano confrontati con tecnica *microarray*, decisamente meno quantitativa e affidabile delle più recenti metodiche di *NGS*. Un'altra importante criticità è rappresentata dall'aver utilizzato, per l'analisi, l'intera popolazione leucocitaria che è molto eterogenea per l'espressione del recettore del GH e, quindi, per la risposta all'ormone somatotropo. Infine, lo studio ha il limite di aver selezionato i gruppi caso-controllo da studi differenti condotti in centri diversi e con metodiche laboratoristiche non standardizzate per la valutazione del picco di GH dopo test di stimolo.

Anche tra gli obiettivi del nostro studio vi è quello di identificare quadri trascrizionali differenziali tra soggetti sani e soggetti con GHD al fine di individuare un pattern di espressione genica monocitaria identificativo per la condizione di deficit di GH e che rappresenti una possibile alternativa ai test di provocazione.

In linea con questo obiettivo, il nostro studio ha evidenziato 58 geni con espressione differenziale tra il gruppo dei pazienti sani e quello con GHD. Questi 58 geni disegnano uno specifico profilo di espressione genica "*geni GHD*" esaminabile su

monociti di sangue periferico. Questo profilo genico, una volta verificato in un numero più ampio di pazienti, potrebbe rappresentare una alternativa ai test di stimolo e orientare la diagnosi del deficit di GH. L'espressione dei *geni GHD*, relativa rispetto ad un pool di geni costanti, potrebbe essere utilizzata in un sistema di analisi NGS di un pannello personalizzato.

L'identificazione di un profilo trascrizionale correlato alla condizione di GHD da ridotta o assente secrezione ormonale, inoltre, apre prospettive future per studi che mirino ad individuare, ad esempio, biomarcatori specifici e diagnostici anche delle altre varianti eziopatogenetiche responsabili dell'alterata funzionalità dell'asse somatotropo (ad esempio, le condizioni legate alla presenza di isoforme del GH con scarsa o assente bioattività ormonale).

Tra i 58 trascritti differenziali identificati, alcuni si distinguevano per la maggiore significatività e valore assoluto di FC, tra i quali RPL10P6 (pseudogene di proteina ribosomiale, FC 24.9), PF4V1 (chemochina, FC 11), ADAMTS2 (metallopeptidasi, FC 14.6), e altri geni i cui prodotti espressi a livelli alterati possono avere effetti biologici o essere solo epifenomeni senza effetti.

L'espressione alterata di questi geni è coerente tra i vari punti sperimentali. La stimolazione con rh-GH modificava l'espressione di 23 geni nei monociti di bambini sani e 4 geni in quelli con GHD e di questi 27 geni, 26 risultavano differentemente espressi nel confronto monociti di bambini con GHD + rh-GH *vs* monociti di bambini sani + rh-GH. Così come 45 dei 58 geni differenzialmente espressi tra monociti di bambini con GHD e sani in condizioni basali erano espressi in modo differente anche tra i due gruppi dopo stimolo con rh-GH (**Figura R5**).

VII. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

I risultati di questo studio dimostrano che il deficit di GH influenza il sistema immunitario nei bambini affetti da GHD, e che il GH ha profondi effetti trascrizionali sui monociti, sia diretti che mediati da altri fattori.

L'analisi ha evidenziato un aumento dei marcatori di maturazione dendritica nei monociti di bambini con deficit di GH rispetto a quelli di bambini sani, aumento che non si riduce dopo stimolo in coltura con rh-GH. Questi risultati sono a favore di un'azione di modulazione indiretta del GH sulla maturazione dendritica. Gli studi pubblicati sugli effetti del GH sul sistema immune sono talvolta contraddittori, pur sostenendo complessivamente un'azione di stimolo, mentre non vi sono studi che documentino alterazioni dello stato immunitario nei bambini con GHD. Alla luce di questi risultati sarà interessante analizzare più approfonditamente la risposta immunitaria o la predisposizione a malattie autoimmuni, allergiche o infiammatorie nei bambini con GHD.

È invece documentato uno stato pro-infiammatorio degli adulti con GHD e in particolare in associazione alla patologia aterosclerotica. Sarà interessante verificare se la componente infiammatoria della placca ateromatosa dei soggetti con GHD risenta del maggior stato di attivazione dendritica conseguente al deficit di GH.

Questo studio ha individuato 58 geni differenzialmente espressi tra i monociti di soggetti sani e con GHD, disegnando uno specifico profilo di espressione genica “*geni GHD*” che potrebbe essere utilizzato in un sistema di analisi NGS di un pannello personalizzato esaminabile su monociti di sangue periferico. Questo profilo genico, una volta verificato in un numero più ampio di pazienti, potrebbe rappresentare una alternativa ai test di stimolo e orientare la diagnosi del deficit di

GH. Il nostro studio, infine, apre prospettive future ad ulteriori lavori che abbiano, come obiettivo, quello di individuare, un profilo trascrizionale o singoli geni specifici per la condizione di GHD.

Riconoscimenti

Desidero ringraziare il *Prof.re A. Weisz* e il *Prof.re V. Casolaro* per il contributo nella fase di progettazione di questo studio,

le *Dott.sse M. Vitale, L. Mautone, Y. D'Agostino* e *R. Tarallo* per la collaborazione nella realizzazione degli esperimenti e del sequenziamento di nuova generazione,

il *Dott.re D. Memoli* per l'analisi bioinformatica e Gene Ontology.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Cappa M, Loche S. Evaluation of growth disorders in the paediatric clinic. *Journal of endocrinological investigation*. 2003;26(7 Suppl):54-63.
2. Loche S, Bizzarri C, Maghnie M, Faedda A, Tzialla C, Autelli M, Casini MR, Cappa M. Results of early reevaluation of growth hormone secretion in short children with apparent growth hormone deficiency. *The Journal of pediatrics*. 2002;140(4):445-449.
3. Maghnie M, Strigazzi C, Tinelli C, Autelli M, Cisternino M, Loche S, Severi F. Growth hormone (GH) deficiency (GHD) of childhood onset: reassessment of GH status and evaluation of the predictive criteria for permanent GHD in young adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(4):1324-1328.
4. Miller KK. Endocrine dysregulation in anorexia nervosa update. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(10):2939-2949.
5. Kreitschmann-Andermahr I, Suarez P, Jennings R, Evers N, Brabant G. GH/IGF-I regulation in obesity--mechanisms and practical consequences in children and adults. *Hormone research in paediatrics*. 2010;73(3):153-160.
6. Bouhours-Nouet N, Gatelais F, Boux de Casson F, Rouleau S, Coutant R. The insulin-like growth factor-I response to growth hormone is increased in prepubertal children with obesity and tall stature. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(2):629-635.
7. Gleeson HK, Lissett CA, Shalet SM. Insulin-like growth factor-I response to a single bolus of growth hormone is increased in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(2):1061-1067.
8. Oostdijk W, Grote FK, de Muinck Keizer-Schrama SM, Wit JM. Diagnostic approach in children with short stature. *Hormone research*. 2009;72(4):206-217.
9. Grote FK, van Dommelen P, Oostdijk W, de Muinck Keizer-Schrama SM, Verkerk PH, Wit JM, van Buuren S. Developing evidence-based guidelines for referral for short stature. *Archives of disease in childhood*. 2008;93(3):212-217.
10. Scherdel P, Dunkel L, van Dommelen P, Goulet O, Salaun JF, Brauner R, Heude B, Chalumeau M. Growth monitoring as an early detection tool: a systematic review. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2016;4(5):447-456.
11. Maghnie M, Labarta JI, Koledova E, Rohrer TR. Short Stature Diagnosis and Referral. *Frontiers in endocrinology*. 2017;8:374.
12. Lausman A, Kingdom J, Maternal Fetal Medicine C. Intrauterine growth restriction: screening, diagnosis, and management. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*. 2013;35(8):741-748.
13. Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(3):804-810.
14. Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P, International Small for Gestational Age Advisory B. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics*. 2003;111(6 Pt 1):1253-1261.
15. Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO. Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocrine reviews*. 2007;28(2):219-251.
16. Stanley T. Diagnosis of growth hormone deficiency in childhood. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2012;19(1):47-52.
17. Guzzetti C, Ibba A, Pilia S, Beltrami N, Di Iorgi N, Rollo A, Fratangeli N, Radetti G, Zucchini S, Maghnie M, Cappa M, Loche S. Cut-off limits of the peak GH

- response to stimulation tests for the diagnosis of GH deficiency in children and adolescents: study in patients with organic GHD. *European journal of endocrinology*. 2016;175(1):41-47.
18. Cornford AS, Barkan AL, Horowitz JF. Rapid suppression of growth hormone concentration by overeating: potential mediation by hyperinsulinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(3):824-830.
 19. Growth Hormone Research S. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(11):3990-3993.
 20. Saggese G, Ranke MB, Saenger P, Rosenfeld RG, Tanaka T, Chaussain JL, Savage MO. Diagnosis and treatment of growth hormone deficiency in children and adolescents: towards a consensus. Ten years after the Availability of Recombinant Human Growth Hormone Workshop held in Pisa, Italy, 27-28 March 1998. *Hormone research*. 1998;50(6):320-340.
 21. Grimberg A, DiVall SA, Polychronakos C, Allen DB, Cohen LE, Quintos JB, Rossi WC, Feudtner C, Murad MH, Drug, Therapeutics C, Ethics Committee of the Pediatric Endocrine S. Guidelines for Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Treatment in Children and Adolescents: Growth Hormone Deficiency, Idiopathic Short Stature, and Primary Insulin-Like Growth Factor-I Deficiency. *Hormone research in paediatrics*. 2016;86(6):361-397.
 22. Maghnie M, Valtorta A, Moretta A, Larizza D, Preti P, Palladini G, Calcante S, Severi F. Diagnosing growth hormone deficiency: the value of short-term hypocaloric diet. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1993;77(5):1372-1378.
 23. Husbands S, Ong KK, Gilbert J, Wass JA, Dunger DB. Increased insulin sensitivity in young, growth hormone deficient children. *Clinical endocrinology*. 2001;55(1):87-92.
 24. Secco A, di Iorgi N, Napoli F, Calandra E, Ghezzi M, Frassinetti C, Parodi S, Casini MR, Lorini R, Loche S, Maghnie M. The glucagon test in the diagnosis of growth hormone deficiency in children with short stature younger than 6 years. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(11):4251-4257.
 25. Stanley TL, Levitsky LL, Grinspoon SK, Misra M. Effect of body mass index on peak growth hormone response to provocative testing in children with short stature. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(12):4875-4881.
 26. Herrington J, Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2001;12(6):252-257.
 27. Lanning NJ, Carter-Su C. Recent advances in growth hormone signaling. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2006;7(4):225-235.
 28. Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carter-Su C. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene*. 2000;19(21):2585-2597.
 29. Gronowski AM, Rotwein P. Rapid changes in nuclear protein tyrosine phosphorylation after growth hormone treatment in vivo. Identification of phosphorylated mitogen-activated protein kinase and STAT91. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(11):7874-7878.
 30. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(9):651-662.
 31. Chia DJ. Minireview: mechanisms of growth hormone-mediated gene regulation. *Molecular endocrinology*. 2014;28(7):1012-1025.
 32. Fan Y, Menon RK, Cohen P, Hwang D, Clemens T, DiGirolamo DJ, Kopchick JJ, Le Roith D, Trucco M, Sperling MA. Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(30):19937-19944.

33. Sos BC, Harris C, Nordstrom SM, Tran JL, Balazs M, Caplazi P, Febbraio M, Applegate MA, Wagner KU, Weiss EJ. Abrogation of growth hormone secretion rescues fatty liver in mice with hepatocyte-specific deletion of JAK2. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(4):1412-1423.
34. Qin Y, Tian YP. Preventive effects of chronic exogenous growth hormone levels on diet-induced hepatic steatosis in rats. *Lipids in health and disease*. 2010;9:78.
35. Kotzka J, Knebel B, Avci H, Jacob S, Nitzgen U, Jockenhovel F, Heeren J, Haas J, Muller-Wieland D. Phosphorylation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a links growth hormone action to lipid metabolism in hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2010;213(1):156-165.
36. Cui Y, Hosui A, Sun R, Shen K, Gavrilova O, Chen W, Cam MC, Gao B, Robinson GW, Hennighausen L. Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration. *Hepatology*. 2007;46(2):504-513.
37. Johansen T, Richelsen B, Hansen HS, Din N, Malmlof K. Growth hormone-mediated breakdown of body fat: effects of GH on lipases in adipose tissue and skeletal muscle of old rats fed different diets. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2003;35(4):243-250.
38. Zhao JT, Cowley MJ, Lee P, Birzniece V, Kaplan W, Ho KK. Identification of novel GH-regulated pathway of lipid metabolism in adipose tissue: a gene expression study in hypopituitary men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(7):E1188-1196.
39. Berryman DE, Glad CA, List EO, Johannsson G. The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(6):346-356.
40. List EO, Berryman DE, Funk K, Gosney ES, Jara A, Kelder B, Wang X, Kutz L, Troike K, Lozier N, Mikula V, Lubbers ER, Zhang H, Vesel C, Junnila RK, Frank SJ, Masternak MM, Bartke A, Kopchick JJ. The role of GH in adipose tissue: lessons from adipose-specific GH receptor gene-disrupted mice. *Molecular endocrinology*. 2013;27(3):524-535.
41. Gurland G, Ashcom G, Cochran BH, Schwartz J. Rapid events in growth hormone action. Induction of c-fos and c-jun transcription in 3T3-F442A preadipocytes. *Endocrinology*. 1990;127(6):3187-3195.
42. Sotiropoulos A, Ohanna M, Kedzia C, Menon RK, Kopchick JJ, Kelly PA, Pende M. Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(19):7315-7320.
43. Parker EA, Hegde A, Buckley M, Barnes KM, Baron J, Nilsson O. Spatial and temporal regulation of GH-IGF-related gene expression in growth plate cartilage. *The Journal of endocrinology*. 2007;194(1):31-40.
44. Devesa J, Almenglo C, Devesa P. Multiple Effects of Growth Hormone in the Body: Is it Really the Hormone for Growth? *Clinical medicine insights Endocrinology and diabetes*. 2016;9:47-71.
45. Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science*. 1982;216(4551):1237-1239.
46. Lindahl A, Isgaard J, Nilsson A, Isaksson OG. Growth hormone potentiates colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture. *Endocrinology*. 1986;118(5):1843-1848.
47. Jux C, Leiber K, Hugel U, Blum W, Ohlsson C, Klaus G, Mehls O. Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology*. 1998;139(7):3296-3305.
48. Dobie R, Ahmed SF, Staines KA, Pass C, Jasim S, MacRae VE, Farquharson C. Increased linear bone growth by GH in the absence of SOCS2 is independent of IGF-1. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(11):2796-2806.

49. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*. 2013;2013:684736.
50. Govoni KE, Wergedal JE, Florin L, Angel P, Baylink DJ, Mohan S. Conditional deletion of insulin-like growth factor-I in collagen type 1alpha2-expressing cells results in postnatal lethality and a dramatic reduction in bone accretion. *Endocrinology*. 2007;148(12):5706-5715.
51. Sohmiya M, Kato Y. Effect of long-term administration of recombinant human growth hormone (rhGH) on plasma erythropoietin (EPO) and haemoglobin levels in anaemic patients with adult GH deficiency. *Clinical endocrinology*. 2001;55(6):749-754.
52. Sohmiya M, Kanazawa I, Kato Y. Effect of recombinant human GH on circulating granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils in patients with adult GH deficiency. *European journal of endocrinology*. 2005;152(2):211-215.
53. Weigent DA. Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cellular immunology*. 2013;285(1-2):118-132.
54. Liu QL, Zhang J, Liu X, Gao JY. Role of growth hormone in maturation and activation of dendritic cells via miR-200a and the Keap1/Nrf2 pathway. *Cell proliferation*. 2015;48(5):573-581.
55. Malarkey WB, Wang J, Cheney C, Glaser R, Nagaraja H. Human lymphocyte growth hormone stimulates interferon gamma production and is inhibited by cortisol and norepinephrine. *Journal of neuroimmunology*. 2002;123(1-2):180-187.
56. Badolato R, Bond HM, Valerio G, Petrella A, Morrone G, Waters MJ, Venuta S, Tenore A. Differential expression of surface membrane growth hormone receptor on human peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorochrome flow cytometry. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1994;79(4):984-990.
57. Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrine reviews*. 2000;21(3):292-312.
58. Ochoa R, Zarate A, Cerbon MA, Salcedo M, Lopez R, Galvan RE, Hernandez M. Expression of growth hormone receptor isoform exon-3-excluding and exon-3-retaining messenger RNAs in peripheral lymphocytes from normal and acromegalic subjects. *Hormone research*. 2003;60(2):68-72.
59. Rapaport R, Sills IN, Green L, Barrett P, Labus J, Skuza KA, Chartoff A, Goode L, Stene M, Petersen BH. Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry: correlation with growth hormone-binding protein levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995;80(9):2612-2619.
60. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*. 2014;15(12):550.
61. Zhou L, Somasundaram R, Nederhof RF, Dijkstra G, Faber KN, Peppelenbosch MP, Fuhler GM. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2012;19(7):1065-1074.
62. Delirez N, Shojaeefar E, Parvin P, Asadi B. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell journal*. 2013;15(3):218-223.
63. Pagani S, Meazza C, Travaglino P, Moretta A, Bozzola M. Effect of growth hormone therapy on the proinflammatory cytokine profile in growth hormone-deficient children. *European cytokine network*. 2005;16(1):65-69.
64. Clark R. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocrine reviews*. 1997;18(2):157-179.

65. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*. 1995;268(5208):251-255.
66. Mustafa A, Nyberg F, Mustafa M, Bakhiet M, Mustafa E, Winblad B, Adem A. Growth hormone stimulates production of interferon-gamma by human peripheral mononuclear cells. *Hormone research*. 1997;48(1):11-15.
67. Bozzola M, De Benedetti F, De Amici M, Jouret B, Travaglini P, Pagani S, Conte F, Tauber M. Stimulating effect of growth hormone on cytokine release in children. *European journal of endocrinology*. 2003;149(5):397-401.
68. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(6):472-484.
69. Fric J, Zelante T, Wong AY, Mertes A, Yu HB, Ricciardi-Castagnoli P. NFAT control of innate immunity. *Blood*. 2012;120(7):1380-1389.
70. Bendickova K, Tidu F, De Zuani M, Kohoutkova MH, Andrejcinova I, Pompeiano A, Belaskova S, Forte G, Zelante T, Fric J. Calcineurin inhibitors reduce NFAT-dependent expression of antifungal pentraxin-3 by human monocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2020;107(3):497-508.
71. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(12):984-993.
72. Larange A, Antonios D, Pallardy M, Kerdine-Romer S. TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *Journal of leukocyte biology*. 2009;85(4):673-683.
73. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *The EMBO journal*. 2014;33(10):1104-1116.
74. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106(3):255-258.
75. Davalos-Miszlitz AC, Rieckenberg J, Willenzon S, Worbs T, Kremmer E, Bernhardt G, Forster R. Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *European journal of immunology*. 2007;37(3):613-622.
76. Dong Z, Chen Y, Peng Y, Wang F, Yang Z, Huang G, Chen Y, Yuan Z, Cao T, Peng Y. Concurrent CCR7 Overexpression and RelB Knockdown in Immature Dendritic Cells Induces Immune Tolerance and Improves Skin-Graft Survival in a Murine Model. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2017;42(2):455-468.
77. Wu WL, Ho LJ, Chen PC, Tsai YT, Hsu ST, Chang DM, Lai JH. Immunosuppressive effects and mechanisms of leflunomide in dengue virus infection of human dendritic cells. *Journal of clinical immunology*. 2011;31(6):1065-1078.
78. Yan Y, Chen R, Wang X, Hu K, Huang L, Lu M, Hu Q. CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;7:212.
79. Nilsson AG, Svensson J, Johannsson G. Management of growth hormone deficiency in adults. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2007;17(6):441-462.
80. Sesmilo G, Biller BM, Llevadot J, Hayden D, Hanson G, Rifai N, Klibanski A. Effects of growth hormone administration on inflammatory and other cardiovascular risk markers in men with growth hormone deficiency. A randomized, controlled clinical trial. *Annals of internal medicine*. 2000;133(2):111-122.
81. Murray PG, Stevens A, De Leonibus C, Koledova E, Chatelain P, Clayton PE. Transcriptomics and machine learning predict diagnosis and severity of growth hormone deficiency. *JCI insight*. 2018;3(7).