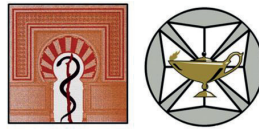




UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



Facultad de Medicina y Enfermería
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



IMIBIC

INSTITUTO MAIMÓNIDES DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DE CÓRDOBA

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA

DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

**VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE
NIÑOS PREPUBERALES CON DÉFICIT DE GH Y TRAS
TRATAMIENTO CON HORMONA DE CRECIMIENTO**

ISABEL RUIZ SÁNCHEZ

TESIS DOCTORAL

CÓRDOBA 2018

TITULO: VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE NIÑOS
PREPUBERALES CON DÉFICIT DE GH TRAS TRATAMIENTO CON
HORMONA DEL CRECIMIENTO

AUTOR: *Isabel Ruiz Sánchez*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



UNIVERSIDAD
D
CORDOBA

Dpto. de Especialidades Médico Quirúrgicas
e-mail: espmedicoquirurgicas@uco.es


IGNACIO ORTEA GARCÍA, COORDINADOR DE LA PLATADORMA UCAIB PROTEÓMICA DEL IMIBIC (DIRECTOR), MERCEDES GIL CAMPOS, PROFESORA TITULAR DE PEDIATRÍA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA (DIRECTORA Y TUTORA CLÍNICA) y RAMÓN CAÑETE ESTRADA, PROFESOR TITULAR DE PEDIATRÍA (JUBILADO) Y PROF. HONORÍFICO DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (CO-DIRECTOR)


INFORMAN:

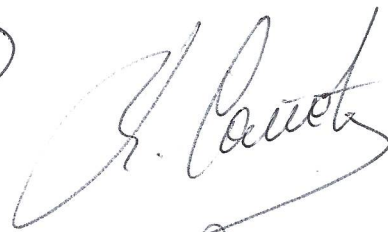
Que Doña Isabel Ruiz Sánchez, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada, ha realizado bajo nuestra dirección compartida, el presente trabajo titulado **“VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE NIÑOS PREPUBERALES CON DÉFICIT DE GH Y TRAS TRATAMIENTO CON HORMONA DE CRECIMIENTO”** y que a nuestro juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor.

Y para que conste firmamos el presente en Córdoba a veinte de septiembre de dos mil diez y ocho

Avda. Menéndez Pidal, s/n 14004 Córdoba. Tel. y Fax: 957 218248. / Tel.: 957 218300. E-mail: espmedicoquirurgicas@uco.es


IGNACIO ORTEA


Mercedes Gil
Campos


Prof. Ramón Cañete

AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

Al Prof. Ramón Cañete Estrada por ser el padrino en mi bautizo en la investigación. Por saber inculcarme la pasión por el conocimiento, siendo mi gran apoyo durante la realización de esta tesis. Agradecerle que pusiera a mi disposición toda su experiencia y conocimientos adquiridos durante su extensa carrera profesional, inculcándome ilusión y las fuerzas necesarias para continuar en aquellos momentos de flaqueza.

Al Dr. Ignacio Ortea García parte fundamental de este trabajo al hacerme partícipe de sus conocimientos, descubriéndome aspectos de la proteómica desconocidos para mí. Por su empeño en la calidad de esta tesis, así como por aquellos momentos compartidos.

A la Prof. María Mercedes Gil Campos por su valiosa ayuda y disposición a ayudarme en todo lo necesario, siendo otro de los grandes resortes en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. María Dolores Cañete por su inestimable colaboración y ayuda en la preparación y acondicionamiento de las muestras. Por todos los encuentros llenos de complicidad e inquietud por un trabajo bien hecho.

Al Dr. Javier Caballero Villarraso que ha colaborado en este trabajo cuando más lo necesitábamos. Gracias por aportar tus conocimientos y perspectivas en esta tesis.

Al IMIBIC, especialmente al D José Miguel Guzmán de Damas. Por tener siempre una puerta abierta para mí y poner a mi disposición sus instalaciones sin olvidar la amabilidad y disposición de todos sus integrantes.

Al Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y su Fundación (FIBICO) por darme mi primera oportunidad laboral relacionada con la investigación, que me permitió conocer a excelentes profesionales e investigadores, entre ellos a todos los colaboradores de esta tesis y en especial al Dr. Ramón Cañete y la Dra. María Dolores Cañete.

A mi marido, Jorge Perea Órpez, quien siempre ha estado animándome durante estos años de duro trabajo. Gracias por estar a mi lado en los momentos difíciles, dándome fuerzas cuando más lo necesitaba.

A mi abuelo, Eugenio Sánchez Díaz, que desde su laboratorio supo despertar en mi la inquietud del conocimiento científico, entre tubos de ensayos y muestras a analizar siempre tuvo un momento de dedicación para explicar su trabajo a su nieta.

A mis padres, Juan Ramón Ruiz Hurtado y Eugenia Sánchez Ruiz, por infundirme ilusión en el trabajo de cada día, la importancia de la constancia y la calidad. Por todo su cariño y afecto mostrado hacia mí siempre.

A todos los niños y familias que han hecho posible este trabajo de investigación. Por su colaboración desinteresada, facilitando esta investigación. Sin ellos, todo esto no habría sido posible.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta tesis se han publicado en el siguiente artículo (factor de impacto JCR 2017: 3,722, estando clasificada en el primer cuartil del área *Biochemical Research Methods*):

Ortea I, Ruiz-Sánchez I, Cañete R, Caballero-Villarraso J, Cañete MD. **Identification of candidate serum biomarkers of childhood-onset growth hormone deficiency using SWATH-MS and feature selection.** J Proteomics. 2018; 175: 105-113.

COMUNICACIONES

Se detallan las comunicaciones derivadas de esta tesis. La segunda con premio Ballabriga.

Cañete Estrada R, Ruiz Sánchez I, Cañete Vázquez MD, Caballero Villarraso J, Gálvez Chicano E, Ortea García I. (Mayo de 2017). Contribución al diagnóstico del déficit de hormona de crecimiento (DGH). Nuevos marcadores. 39 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica. Congreso llevado a cabo en Málaga.

En los V Premios IMIBIC-Roche de Innovación Biomédica celebrados el 11 de junio de 2018 se ha premiado el trabajo que lleva por título "Método rápido de detección por proteómica de biomarcadores séricos para el diagnóstico del déficit de hormona de crecimiento en el niño" presentado por los Doctores: Ignacio Ortea García, Isabel Ruiz Sánchez, Ramón Cañete Estrada y María Dolores Vázquez Cañete dentro de la categoría "Proyectos de innovación basados en nuevas ideas o resultados derivados de la investigación biomédica"

ÍNDICE

ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XXI

I. ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. Eje Hipotálamo-Hipofisario	23
1.1.1. El eje de la hormona de crecimiento (GH).....	24
1.1.2. Síntesis y secreción de la GH.....	25
1.2. Déficit de la hormona de crecimiento en niños	27
1.2.1. Diagnóstico del déficit de la hormona de crecimiento.....	29
1.2.1.1. Pruebas de imagen.....	31
1.2.1.2. Estudio genético.....	33
1.2.1.3. Criterios auxológicos.....	33
1.2.1.4. Examen radiológico.....	33
1.2.1.5. Diagnóstico endocrinológico.....	34
1.3. Tratamiento con GH en niños con DGH	35
1.4. Adherencia al tratamiento de la GH	36
1.5. Tratamiento con biosimilares de la GH	37
1.6. Efectos adversos del tratamiento con GH	38
1.7. Periodo de transición de la infancia a adultos	39
1.8. Tratamiento con GH en el niño con procesos hemato-oncológicos	39
1.9. Indicaciones del tratamiento con GH	40
1.10. Acciones de la hormona de crecimiento (GH)	41
1.10.1. Introducción.....	41
1.10.2. Crecimiento longitudinal. Acciones directas e indirectas.....	42
1.10.3. Acción sobre el músculo.....	43
1.10.4. GH y riñón. Natriuresis. Calcio, nitrógeno, fósforo y potasio.....	43
1.10.5. GH y composición corporal.....	44
1.10.6. GH y metabolismo de los hidratos de carbono (glucosa y glucógeno).....	44
1.10.7. Efectos sobre la insulina.....	44
1.10.8. GH y metabolismo de los lípidos (lipólisis).....	45
1.10.9. Efectos sobre la coagulación y fibrinólisis.....	46
1.10.10. GH y adipocinas (leptina, adiponectina, etc.).....	46
1.10.11. Efectos cardiovasculares.....	46
1.10.11.1. Marcadores predictivos de enfermedad cardiovascular.....	48
1.10.12. Efectos sobre la retina.....	49
1.10.13. Efectos en pacientes con enfermedad renal crónica (IRC).....	50
1.10.14. Funciones sobre el intestino.....	51
1.11. Mal uso y abuso de la GH en el deporte	51
1.12. Marco conceptual	53

1.13. ÓMICAS	54
1.13.1. Introducción.....	54
1.13.2. Genómica	55
1.13.3. Transcriptómica.....	56
1.13.4. Epigenómica.....	56
1.13.5. Metabolómica	57
1.13.6. Proteómica	57
1.13.6.1. <i>Áreas generales de la proteómica</i>	57
1.13.6.1.1. Proteómica cualitativa	58
1.13.6.1.2. Proteómica diferencial/cuantitativa. Técnica SWATH	59
1.13.6.1.3. Proteómica funcional.....	61
1.13.6.2. <i>Flujos de trabajo en proteómica: proteómica bottom-up</i> <i>y proteómica top-down</i>	61
1.13.6.3. <i>Preparación de la muestra</i>	63
1.13.6.4. <i>Proteómica basada en la espectrometría de masas</i>	64
1.13.6.4.1. Espectrometría de masas.....	65
1.14. Biomarcadores.....	66
2. JUSTIFICACIÓN	71
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	73
3.1. Hipótesis conceptual	73
3.2. Hipótesis operativa.....	73
3.3. Objetivo general.....	73
3.4. Objetivos específicos	73
4. MATERIAL Y MÉTODOS	75
4.1. Diseño experimental.....	75
4.1.1. Muestra	75
4.1.2. Sujetos	75
4.1.2.1. <i>Criterios de inclusión</i>	75
4.1.2.2. <i>Criterios de exclusión</i>	76
4.1.2.3. <i>Aspectos éticos y consentimientos informados</i>	76
4.2. Métodos.....	76
4.2.1. Historia clínica, exploración física y antropométrica.....	77
4.2.1.1. <i>Historia clínica</i>	77
4.2.1.2. <i>Antropometría</i>	77
4.2.1.3. <i>Pruebas de provocación: procedimientos</i>	78
4.2.2. Análisis proteómicos	79
4.2.2.1. <i>Pretratamiento de muestras y normalización de proteínas</i>	79
4.2.2.2. <i>Precipitación proteica y cuantificación de proteína total</i>	80
4.2.2.3. <i>Digestión de proteínas</i>	81
4.2.2.4. <i>Análisis LC-MS</i>	81
4.2.2.4.1. <i>Creación de la librería espectral</i>	81
4.2.2.4.2. <i>Cuantificación relativa mediante SWATH</i>	83

4.2.3. Estudio estadístico de datos.....	84
4.2.3.1. <i>Análisis de los datos antropométricos</i>	84
4.2.3.2. <i>Análisis de los datos proteómicos</i>	85
4.2.3.2.1. Abundancia relativa de cada proteína.....	85
4.2.3.2.2. Selección de los mejores biomarcadores potenciales.....	85
4.2.3.2.3. Análisis pathway y análisis de Gene Ontology.....	85
4.3. Base de datos. Funcionalidad de proteínas.....	86
5. RESULTADOS.....	87
5.1. Análisis datos demográficos y antropométrico	87
5.2. Análisis shotgun y creación de bibliotecas de espectros.....	88
5.3. Análisis SWATH	89
5.4. Cambios en abundancia proteica entre enfermos (DGH) y controles sanos.....	90
5.5. Cambios en abundancia proteica en niños con DGH tras tratamiento vs DGH al diagnóstico	92
5.6. Identificación de proteína que se corrigen tras tratamiento con GH.....	94
5.7. Análisis pathway y de Gene Ontology (comparación DGH (basal) – controles).....	96
5.8. Selección de biomarcadores diferenciadores de los grupos DGH basal y control.....	98
6. DISCUSIÓN	101
6.1. Selección de los pacientes, tamaño de la muestra, valoración clínica y antropométrica, toma de muestras y aspectos metodológicos.....	101
6.2. Análisis proteómico.....	103
6.3. 6.3. Identificación de las proteínas y análisis pathway DGH basal versus controles sanos.....	103
6.3.1. Selección de biomarcadores.....	104
6.3.2. Significado biológico de las proteínas que tras aplicar los algoritmos separan con 100% de sensibilidad y especificidad	104
6.4. Identificación de proteínas con abundancia diferencial tras tratamiento DGH 6 meses versus DGH basal	107
6.4.1. Significado biológico de las proteínas	107
6.5. Proteínas que no estando alteradas en DGH basal, tras el tratamiento se modifican	109
6.5.1. Significado biológico de las 9 proteínas que no estando alteradas en el DGH periodo basal, tras el tratamiento se modifican.	109
6.5.1.1. <i>K1C9 (Keratin type I cytoskeletal 9). Queratina tipo I citoesqueleto 9</i>	109
6.5.1.2. <i>IGF-1 (Insulin-like growth factor 1). Factor de crecimiento insulínico tipo 1</i>	110
6.5.1.3. <i>APMAP (Adipocyte plasma membrane-associated protein). Proteína asociada con la membrana plasmática en adipocitos</i>	110
6.5.1.4. <i>IGFBP6 (Insulin-like growth factor-binding protein 6). Proteína 6 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina</i>	110
6.5.1.5. <i>CD5L (CD5 antigen-like). Antígeno similar de la proteína CD5</i>	111
6.5.1.6. <i>C4BPB (C4b-binding protein beta chain). Proteína de unión a la fracción C4b del complemento</i>	112
6.5.1.7. <i>MBL 2 (Mannose-binding protein C).Lecitina de unión a la manosa C</i>	112
6.5.1.8. <i>TRY1 (Trypsin-1). Tripsina 1</i>	113
6.5.1.9. <i>PSG1 (Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 1). Beta-1-glicoproteína específica del embarazo</i>	113

7. CONCLUSIONES	115
8. BIBLIOGRAFÍA	117
9. RESUMEN / SUMMARY	155
10. FINANCIACIÓN	159
11. ANEXOS	161

II. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **ACN:** Acetonitrilo
- **ACTH:** Hormona adrenocorticotropa
- **ADMA:** Dimetilarginina asimétrica
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AEMPS:** Agencia española del medicamento y productos sanitarios
- **AMA o WADA:** Agencia mundial antidoping
- **APMAP:** Proteína asociada a la membrana plasmática de adipocitos
- **APOA4:** Apolipoproteína A4
- **APOC4:** Apolipoproteína C4
- **APOF:** Apolipoproteína F
- **AQUA:** Cuantificación absoluta
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **ARNi:** ARN de interferencia
- **ARNm:** ARN mensajero
- **ARNr:** ácido ribonucleico ribosómico
- **ARNt:** ARN de transferencia
- **ASC:** Área superficial corporal
- **AUC:** Área bajo la curva

- **C4BPA:** Proteína de unión a la cadena alfa del C4b del complemento
- **C4BPB:** Proteína de unión a la cadena beta del complemento C4
- **CD5L:** Proteína similar al antígeno CD5
- **CHMP:** Comité de medicamentos de uso humano
- **cHDL:** Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad
- **cLDL:** Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad
- **CPLL:** Bibliotecas combinatorias de ligandos peptídicos
- **CRH:** Hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa
- **CXCL7:** Proteína activadora de neutrófilos
- **DDA:** Adquisición dependiente de datos
- **DGH:** Déficit de Hormona de crecimiento
- **DIA:** Adquisición independiente de datos
- **DIGE:** Electroforesis diferencias en gel
- **DMHH:** Deficiencia múltiple de hormonas hipofisarias
- **DMO:** Densidad mineral ósea
- **DS:** Desviación estándar
- **DTT:** Ditioneitol
- **DXA:** Densitometría ósea
- **ECM1:** Proteína 1 de la matriz extracelular
- **ECV:** Enfermedad cardiovascular
- **EEM:** error estándar de la media
- **ELISA:** Ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas

- **EMA** o **EMA**: Agencia europea del medicamento
- **ESI**: Fuente de ionización por electrospray
- **FXIII**: Cadena A del factor XIII de la coagulación.
- **FDA**: Agencia americana de alimentos y medicamentos
- **FDR**: Tasa de descubrimientos falsos
- **FHR4**: Proteína 4 del factor H del complemento
- **FIBA**: Cadena alfa del fibrinógeno
- **FIFA**: Federación internacional de fútbol asociación
- **FN1**: Fibronectina
- **FSH**: Hormona folículo estimulante
- **Gen BRCA1**: Gen de cáncer de mama 1
- **Gen BRCA2**: Gen de cáncer de mama 2
- **Gen FN1**: Gen fibronectina 1
- **GH**: Hormona de crecimiento
- **GHBP**: Proteína de unión a la hormona de crecimiento
- **GHR**: Receptor de la hormona de crecimiento
- **GHRH**: Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
- **GHRHR**: Receptor de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento
- **GHS-R**: Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento
- **GnRH**: Hormona liberadora de gonadotropina
- **GO**: Gene ontology
- **HDL**: Lipoproteínas de alta densidad

- **HOMA-IR:** Índice de resistencia a la insulina
- **HOMA-S:** Sensibilidad a la insulina
- **HPLC:** Cromatografía líquida de alto rendimiento
- **HURS:** Hospital Universitario Reina Sofía
- **IAA:** Iodoacetamida
- **ICAT:** Marcaje de afinidad codificada por isótopos
- **ICPL:** Marcaje proteico codificado por isótopos
- **IDO:** Índice de disposición oral
- **IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1 o somatomedina C
- **IGF-2:** Factor de crecimiento insulínico tipo 2
- **IGFBP:** Proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulínico
- **IGFBP-3:** Proteína de unión 3 al factor de crecimiento de tipo insulínico
- **IGFBP-6:** Proteína de unión 6 al factor similar a la insulina
- **IGFs:** Factor de crecimiento insulínico
- **IGI:** Índice insulinogénico
- **IL-6:** Interleucina 6
- **IMC:** índice de masa corporal
- **IMIBIC:** Instituto Maimonides de Investigación Biomédica de Córdoba
- **IRC:** Insuficiencia renal crónica
- **IT:** Trampa iónica
- **ITRAC:** Marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta
- **K1C9:** Keratina 1 del Citoesqueleto 9

- **LC/MS:** Cromatografía líquida/espectrometría de masas
- **LC-MS/MS:** Cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem
- **LDL:** Lipoproteínas de baja densidad
- **LH:** Hormona luteinizante
- **m/z:** Masa-carga
- **M:** mujer
- **MBL2:** Lecitina de unión a la manosa C
- **miARN:** micro ARN
- **MLG:** Masa libre de grasa o masa magra
- **mmHg:** milímetros de mercurio
- **MS imaging:** Espectrometría de masas por imagen
- **MS/MS:** Espectrometría de masas en tándem
- **MS:** Espectrometría de masas
- **n-LC-MS/MS:** Nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
- **NO:** Óxido Nítrico
- **NOS:** Óxido nítrico sintasa
- **OMS:** Organización mundial de la salud
- **PAI-1:** Inhibidor del activador del plasminógeno 1
- **PAM:** Análisis de predicción microarrays
- **PEG:** Pequeño para la edad gestacional
- **PFF:** Técnica de la fragmentación de péptidos
- **PIH:** Hormona inhibidora de la prolactina

- **P-III-NP:** Péptido procolágeno amino terminal tipo III
- **PIT-1:** Factor de transcripción específico de la pituitaria
- **PMF:** Técnica de la huella peptídica
- **Proteína FN1:** Proteína fibronectina 1
- **PSG1:** Glicoproteína 1 beta específica del embarazo
- **PTH:** Hormona paratiroidea
- **PTM:** Modificaciones postraduccionales
- **Q:** Cuadrupolo
- **Q1:** Primer cuadrupolo
- **RAS:** Sistema renina angiotensina
- **rhGH:** Hormona de crecimiento humana recombinante
- **RM:** Resonancia magnética
- **SAA2:** Proteína amiloide sérica A 2
- **SAA4:** Proteína amiloide sérica A 4
- **SAC:** Servicio de análisis clínicos
- **SAL:** Subunidad ácido lábil
- **SC:** Superficie corporal
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- **SELDI-TOF:** Desorción/ionización asistida en matriz con láser-tiempo de vuelo
- **SIC:** Síndrome del intestino corto
- **SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- **SILAC:** Etiquetado de isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular

- **SNC:** Sistema nervioso central
- **SRM:** Monitoreo de reacción seleccionada
- **SS:** Somatostatina o Hormona inhibidora de la hormona de crecimiento
- **T4:** Tiroxina
- **TAD:** tensión arterial diastólica
- **TAS:** tensión arterial sistólica
- **TCA:** Ácido tricloroacético-acetona
- **Técnica SWATH:** Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra
- **TFA:** Ácido trifluoroacético
- **TFG:** Tasa de filtración glomerular
- **TMT:** Etiquetados de masas tándem
- **TNF-alfa:** Factor de necrosis tumoral alfa
- **TOF:** Tiempo de vuelo
- **t-PA:** Activador tisular del plasminógeno
- **TRH:** Hormona liberadora de tirotropina
- **TRY1:** Tripsina 1
- **TSH:** Hormona estimulante del tiroides
- **TTI:** Test de tolerancia a la insulina
- **Método TW2-RUS:** Método de Tanner-whitehouse 2 con sus sistemas RUS (radio, cúbito y huesos cortos)
- **Método TW3-RUS:** Método de Tanner-whitehouse 3 con sus sistemas RUS (radio, cúbito y huesos cortos)
- **UHPLC:** Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento

- **V:** varón
- **Vía JAK/STAT:** Vía Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción
- **VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad
- **XIC:** Cromatograma extraído de iones

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Causas de deficiencia o de acción de la hormona de crecimiento (disponible en Cañete Estrada et al, 2009, Cañete et al, 2015) **28**

Tabla 2. Acciones de la GH. **42**

Tabla 3. Marcadores de riesgo CV en niños con DGH (De Leonibus et al, 2016). **49**

Tabla 4. Principales tipos de «ómicas» (Suravajhala et al, 2016). **55**

Tabla 5. Principales aproximaciones tradicionales en proteómica cuantitativa (disponible en Gallardo et al, 2013). **60**

Tabla 6. Etapas en el desarrollo de un test de biomarcadores (Disponible en Rifai et al, 2006). **68**

Tabla 7. Muestras incluidas en el estudio, distribución de muestras en cada grupo, y distribución de las muestras en “pools”. **82**

Tabla 8. Medidas antropométricas de niños con DGH (Casos) y Controles prepuberales a tiempo basal. **87**

Tabla 9. Medidas antropométricas de los casos (DGH) tras 6 meses de tratamiento y Controles prepuberales a tiempo basal. **88**

Tabla 10. Medidas antropométricas de los casos (DGH) tras 6 meses de tratamiento y Casos (DGH) prepuberales a tiempo basal. **88**

Tabla 11. Proteínas mostrando una diferencia significativa en abundancia y un fold-change superior a 2,0 (o inferior a 0,5) entre el grupo con DGH y el grupo de control. **91**

Tabla 12. Proteínas con diferencias estadísticamente significativas en abundancia tras 6 meses de tratamiento con GH (DGH t6) vs DGH basal (t0). **93**

Tabla 13. Valores de fold-change DGH basal/control y valores de fold-change DGH t6 vs DGH t0 para cada una de las 30 proteínas que se han alterado tras el tratamiento y DGH basal vs Control. **95**

Tabla 14. Proteínas que no estando cambiadas en el periodo basal DGH t0, se modifican tras 6 meses de tratamiento con GH. **96**

Tabla 15. Resultado del análisis de Gene Ontology. Componentes celulares, funciones moleculares y procesos biológicos sobrerrepresentados entre las proteínas con abundancia diferencial entre el grupo DGH y el grupo de control. **98**

Tabla 16. Medición niveles séricos del perfil lipídico en ambos grupos (DGH y Control), y valor p de los test que evalúan diferencias estadísticamente significativas. **98**

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las hormonas hipofisarias (Cortesía del Dr. Cañete) 24

Figura 2. Regulación de la secreción de GH por el eje Hipotálamo-Hipofisario (Tomado de Cañete, 2009; Cañete MD, 2015) 26

Figura 3. Reproducción RM del eje hipotálamo-hipófisis de un niño con neurohipófisis ectópica (Cortesía Dr. Cañete) 32

Figura 4. Corte de radiografía lateral de la silla turca. Calcificación intrasellar por craneofaringioma (Cortesía del Dr. Cañete). 32

Figura 5. Representación del rango dinámico de concentración de proteínas de plasma y las categorías principales de éstas (Anderson, Anderson, 2002). 67

Figura 6. Diseño del estudio en el tiempo. 77

Figura 7. Densidad iónica obtenida a partir de las pruebas DDA y anchura de ventana empleada para el método de adquisición SWATH. 89

Figura 8. Heat Map y agrupamiento no supervisado de los 30 sujetos analizados empleando las 121 proteínas de suero cambiando en abundancia a partir del test de Mann Whitney según la medición por SWATH del primer experimento. 92

Figura 9. Proteínas presentando abundancia diferencial en las dos comparaciones, DGH basal vs Control, y DGH t6 (tratamiento con GH durante 6 meses) vs DGH basal. 94

Figura 10. Análisis Pathway. A, Rutas metabólicas afectadas y sus valores p asociados. B, proteínas con abundancia diferencial (DGH vs Control) para los tres pathways con menores p-valores. C, diagrama del pathway de adhesión focal (KEGG:04510). 97

Figura 11. Resumen del resultado de la selección de biomarcadores (feature selection). 100

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Eje Hipotálamo-Hipofisario

La hipófisis es una glándula que se encuentra en la base del cráneo, en una estructura ósea llamada silla turca situada en el hueso esfenoides y produce diferentes hormonas que van a actuar sobre distintas partes del organismo (Hong et al, 2016; ElSayed y Bhimji, 2018-2017; Gounden y Jialal, 2018-2017).

Queda constituida por dos sectores netamente diferenciables, la adenohipófisis y la neurohipófisis. En la primera se van a producir, liberar y segregar diferentes hormonas que van a actuar sobre los órganos, tales como: La hormona de crecimiento (GH), corticotropina (ACTH), hormona estimulante del tiroides (TSH), las gonadotropinas (FSH y LH) y la prolactina (Hong et al, 2016; ElSayed y Bhimji, 2018-2017; Gounden y Jialal, 2018-2017) (Figura 1).

En la segunda, se segrega, la vasopresina o antidiurética y la oxitocina, ambas producidas en el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo y posteriormente se almacenan en la neurohipófisis (Hong et al, 2016; ElSayed y Bhimji, 2018-2017; Gounden y Jialal, 2018-2017) (Figura 1).

En el hipotálamo se producen hormonas que actúan sobre la hipófisis tales como: TRH (hormona liberadora de tirotropina), CRH (hormona liberadora de corticotropina), GHRH (hormona liberadora de hormona de crecimiento) y GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) y las inhibidoras, PIH (inhibidora de la prolactina) y SS (somatostatina) (Hong et al, 2016).

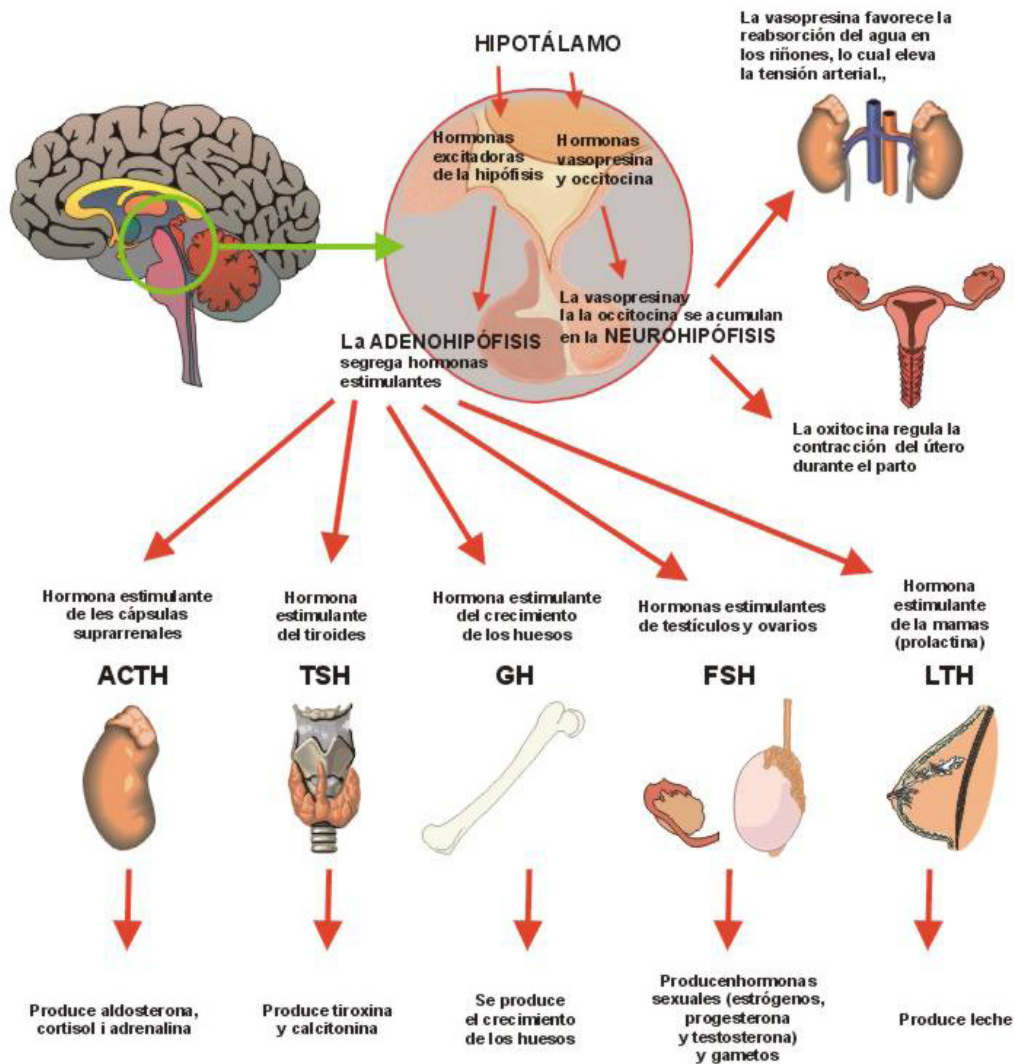


Figura 1. Esquema de las hormonas hipofisarias (Cortesía del Dr. Cañete)

1.1.1. El eje de la hormona de crecimiento (GH)

La hormona de crecimiento (GH) es una hormona polipeptídica de 191 aminoácidos con 2 puentes disulfuro, producida en las células somatotropas de la adenohipófisis (Brinkman y Sharma, 2018). Existen varias isoformas, siendo las más abundantes, la de 22 (principal isoforma) y 20 kDa (Rigamonti et al, 2015). El locus que regula la síntesis de GH humana se encuentra en el cromosoma 17 (17q22-24) y consta de 5 genes homólogos, constituyendo el denominado *clúster* (Alatzoglou y Dattani, 2010; Brooks y Waters, 2010; Cañete et al, 2015; Brinkman y Sharma, 2018)

Su regulación es compleja (Alatzoglou y Dattani, 2010). La expresión de la GH parece estar determinada principalmente por el gen Prop-1 y el factor de transcripción Pit-1 (Birla et al, 2016b). Mutaciones en estos podrían estar asociadas con el síndrome de deficiencia de la GH (DGH), que puede estar acompañado de otras deficiencias de hormonas hipofisarias (Birla et al, 2016a; Tóke et al, 2018).

1.1.2. Síntesis y secreción de la GH

La síntesis de GH se produce en las células somatotropas de la adenohipófisis. (Oświęcimska et al, 2016; Brinkman y Sharma, 2018).

Es secretada en forma de pulsos (Albertsson-Wikland et al, 1994), siendo esta más frecuente durante la noche. En el intervalo entre pulsos, la concentración en suero puede no ser detectable (Holl et al, 1991; Steyn, 2015; Brinkman y Sharma, 2018).

La secreción está regulada principalmente por dos péptidos hipotalámicos: la GHRH que estimula la síntesis y secreción de GH y SS que inhibe su liberación. Tanto GHRH como la SS están en relación con el sistema adrenérgico (α - 2 y β - 2) respectivamente. A su vez, ambos péptidos están en conexión con distintos productos bioquímicos que actúan aumentando o disminuyendo su salida a la sangre (Müller et al, 1999; Steyn et al, 2016; Brinkman y Sharma, 2018) (Figura 2).

Asimismo, la liberación de GH está regulada metabólicamente por sustratos energéticos, glucosa y ácidos grasos libres y aminoácidos. Así, por ejemplo, la hipoglucemia o los ácidos grasos libres estimulan la secreción de GH, mientras que la elevación de los mismos la reduce. También el ayuno, la deprivación prolongada de proteínas y calorías incrementa su secreción. Igualmente, otros factores que influyen son el ejercicio, sueño y estrés (Huang et al, 2014). También existen hormonas que estimulan su secreción como: andrógenos (Meinhardt y Ho et al, 2006), insulina (Leung et al, 2000) y hormona tiroidea (Purandare et al, 2003); y otras la inhiben como los estrógenos en altas concentraciones (Blum et al, 2018).

La inflamación crónica de determinadas enfermedades como la enfermedad de Crohn puede afectar a la concentración de GH e IGF-1. Además, se ha encontrado que determinadas citoquinas proinflamatorias, como el TNF-alfa interfiere en la producción de IGF-1 llevando a la resistencia de GH en el hígado (Zhao et al, 2014) y alteraciones en la proliferación y diferenciación de los condrocitos por la disminución de su concentración (Choukair et al, 2014).

Existen también los secretagogos de la GH, que son sustancias sintéticas, no endógenas, que actúan sobre un receptor de membrana en las células somatotropas diferente del receptor de la GHRH (Poher et al, 2018). La *ghrelina* o *ghrelin*, es un péptido que se sintetiza en las células del fundus gástrico del estómago y actúa sobre el receptor de los secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R). Además de estimular la secreción de GH en la hipófisis, tiene múltiples funciones metabólicas y nutricionales (Brinkman et al, 2018; Poher et al, 2018; Tokudome et al, 2018).

Por otro lado, existen factores de transcripción, (PIT1, PROP 1) que van a actuar activando señales que llegan de la GHRH y su ausencia puede producir diversas patologías (Powers, 2012; Benso et al, 2013; Carreira et al, 2013; Cañete et al, 2015; Murray et al, 2015; Plant, 2015; Birla et al, 2016a, b; Steyn et al, 2016; Motta et al, 2016).

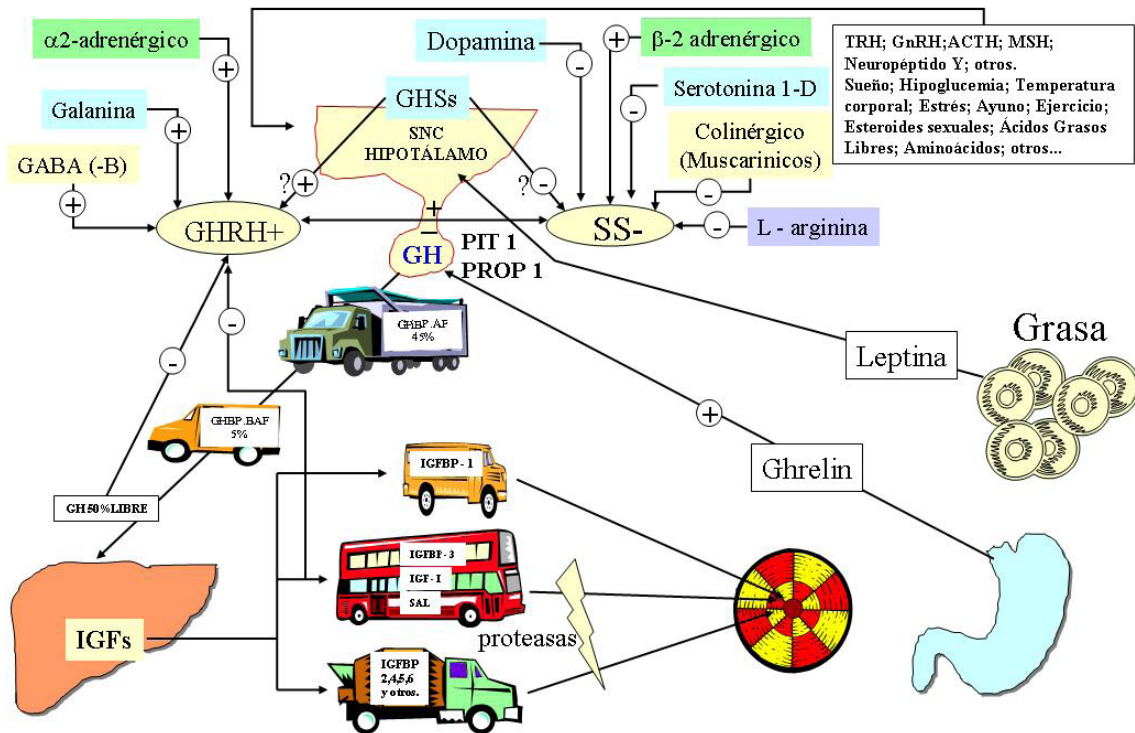


Figura 2. Regulación de la secreción de GH por el eje Hipotálamo-Hipofisario (Tomado de Cañete, 2009; Cañete MD, 2015)

La GH se une a su receptor (GHR) y a la proteína de unión GHBP ((*Growth Hormone Binding Protein*)) con alta afinidad y especificidad. Aproximadamente un 45% de la GH se une a la GHBP (Waters et al, 2016).

La GHBP se encuentra circulando en el suero. El receptor de la GH está presente principalmente en el hígado, también se encuentra en todos los tejidos diana donde realizará sus efectos. (Kelly et al, 1991;Edens y Talamantes, 1998).Su parte extracelular es igual a la GHBP. Por un proceso de dimerización vía JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducing activators of transcription*) trasmite la señal que libera factores de crecimiento similares a la insulina, IGF-1 o somatomedina C (*Insulin-Like Growth Factor*) que son GH dependientes e IGF-2, la primera circula unida a una serie de proteínas IGF-BP (*IGF-binding proteins*)(Dehkhoda et al, 2018). Existen al menos 6 (Hwa et al, 1999), siendo la más importante la IGFBP-3, también GH dependiente (Waters, 2016).En el hígado se produce, además, SAL (subunidad ácido lábil) que junto a la IGF-1 y la IGFBP-3, constituyen el complejo ternario de GH que son GH dependientes (David et al, 2011).

Al actuar sobre el hueso hay proteasas que liberan la GH para estimular el crecimiento lineal. La GH libre, *per se*, también actúa sobre la placa de crecimiento (Cañete et al, 2015).

1.2. Déficit de la hormona de crecimiento en niños

El déficit de la hormona del crecimiento (DGH) es una causa importante de talla baja en la infancia. Es muy heterogénea en términos de su etiología, patogenia y edad a la que se diagnostica, siendo una condición marcada por una ausencia completa o parcial de GH en plasma o suero, congénita o adquirida, con una presentación de déficit aislado o en asociación de otras hormonas (Cañete Estrada y Gil Campos, 2009).

Se caracteriza por una combinación de anormalidades auxológicas, clínicas, genéticas, radiológicas, metabólicas y hormonales, que pueden estar presentes en mayor o menor medida (Cañete Estrada y Gil Campos, 2009; Chinoy y Murray, 2016).

Es presumible que la prevalencia del DGH pueda situarse entre 1:4.000 y 1:10.000 (Growth Hormone Research Society, 2000). En el 80% de los casos la causa es desconocida DGH idiopático (Cohen et al, 2008), siendo un 20% el DGH adquirido.

El DGH idiopático u orgánico se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Causas de deficiencia o de acción de la hormona de crecimiento (disponible en Cañete Estrada et al, 2009, Cañete et al, 2015).

Hipopituitarismo idiopático.	Disgenesia Hipofisaria
Síndromes genéticos de la hormona del crecimiento o del GHRH (Ver capítulo 20).	Ausencia congénita hipofisaria. Hipoplasia hipofisaria. Hipófisis ectópica. Síndrome de la silla turca.
Síndromes de deficiencia del receptor de hormona de crecimiento (Ver capítulo 25).	Alteraciones de la estructura metabolismo o secreción de la hormona de crecimiento
Malformaciones del sistema nervioso central: Anencefalia. Displasia septo-óptica o Síndrome de De Morsier. Anomalías de la línea: Holo prosencefalia de hipófisis. Anoftalmia. Microftalmia. Labio leporino con o sin fisura palatina. Incisivo central único. Encefalocele transesfenoidal. Hendidura facial media Aplasia cutánea medio facial. Otras malformaciones.	Déficit de GHRH o de su receptor. Anomalías del Pit1 y Prop1. Hormona de crecimiento biológicamente inactiva. Disfunción neurosecretora de hormona de crecimiento. Crecimiento sin hormona de crecimiento. Síndrome de hormona de crecimiento invisible. Insuficiencia funcional. Deficiencia adquirida de hormona de crecimiento: Procesos expansivos intracraneales. Craneofaringioma. Disgerminoma. Glioma óptico. Hematoma.
Infecciones prenatales. Rubéola congénita. Toxoplasmosis. Infecciones por citomegalovirus.	Astrocitoma. Hidrocefalia congénita o adquirida. Quistes aracnoideos supraselares.
Síndromes característicos con anomalías de la línea media. S. de ectrodactilia-displasia. Ectodérmica-labio leporino (S.EEC). S. de Aarskog S. de Rieger. S. de Rothmund-Thomson. S. de Juber-Hayward.	Enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central Meningitis. Meningitis tuberculosa. Meningoencefalitis. Traumatismos craneales Radioterapia
Condiciones con tendencia a malignizaciones frecuentes y que se acompañan de roturas cromosómicas in vitro y defectos inmunes. Anemia de Fanconi Ataxia-telangiectasia (S. de Louis Baan). S. de Bloom. Asociación de CHARGE	Enfermedades autoinmunes Generalizadas Hipófisis autoinmunes Accidentes vasculares Con afectación hipotálamo-hipofisaria Trastornos hematológicos
Síndrome que se acompaña de amplias anomalías hipotalámico-cerebrales. S. de Prader-Willi S. de Laurence-Moon-Biedl S. de Keams-Sayre	Histiocitosis Sarcoidosis
Síndromes cromosómicos Otros síndromes.	Hemocromatosis

1.2.1. Diagnóstico del déficit de la hormona de crecimiento

Los criterios para el diagnóstico del DGH son de acuerdo con la Sociedad de Investigación de Hormona de Crecimiento (Growth Hormone Research Society, 2000): talla superior a - 2 SD (Standard Deviation) por debajo de la media de la población; talla superior a 1,5 SD por debajo de la talla genética o diana; velocidad de crecimiento a lo largo de 1 año, superior a 1 SD por debajo de la media para la edad cronológica, la edad ósea estimada a partir de la radiografía de muñeca y mano izquierda de al menos 1 año por debajo de la edad cronológica; 2 pruebas de provocación de GH, con una semana de diferencia, mostrando un pico de concentración de GH inferior a 7,3 ng/mL, medidos por ensayo monoclonal; cariotipo en niñas 46,XX. Debe realizarse Resonancia Magnética (RM) del eje hipotálamo-hipófisis. Los niveles de IGF-1 y IGFBP-3 deben medirse para descartar otras causas del retraso del crecimiento y otros procesos, tales como la talla baja idiopática, pequeños para la edad gestacional (PEG), síndrome de Prader-Willi, insuficiencia renal crónica (IRC), síndrome de Turner y otros (Growth Hormone Research Society, 2000; Vyas et al, 2017). Es importante excluir hipotiroidismo (Behan et al, 2011; Vyas et al, 2017).

Será suficiente un test de estimulación de GH, en aquellos casos con historia definida de patología del sistema nervioso central, historia de irradiación, defecto genético conocido causante de DGH o de la deficiencia múltiple de hormonas hipofisarias (DMHH) (Growth Hormone Research Society, 2000; Cañete et al, 2015)

El DGH puede ocurrir en cualquier edad en la infancia y puede variar en intensidad y duración, aunque el diagnóstico está basado en una evaluación auxológica, junto con pruebas bioquímicas y estudios neurorradiológicos. A pesar de esto, existe una controversia importante en el diagnóstico y manejo del DGH (Chinoy y Murray, 2016).

La hipoglucemia es observada en el DGH congénito, especialmente con ausencia de ACTH (Cerbone y Dattani, 2017). Microgenitalismo se encuentra en algunos casos debido a la deficiencia de gonadotropina pituitaria, evidenciándose en forma de micropene, testículos pequeños, criptorquidia y subdesarrollado en el escroto en los varones e hipoplasia de los labios menores y del clítoris en las niñas. Los signos y síntomas de hipopituitarismo también pueden ser debidos a la deficiencia de TSH (Pombo y Castro-Feijóo, 2005; Cañete Estrada y Gil Campos, 2009; Cañete et al, 2015).

Algunos pacientes al nacer, pueden presentar defectos estéticos faciales, como: labio leporino, fisura palatina o trastornos del desarrollo de la línea media, displasia septo-óptica que posteriormente pueden acompañarse de trastornos de la visión. Si no ha habido ninguna crisis hipoglucémica anterior, el desarrollo psicomotor del niño es probablemente normal (Pombo y Castro-Feijóo, 2005; Cañete Estrada y Gil Campos, 2009; Cañete et al, 2015; Vyas et al, 2017).

A partir del tercer mes de vida en adelante y especialmente, alrededor de los 18 meses de edad, el crecimiento comienza a ralentizarse notablemente, y a la edad de 2-3 años la talla se encuentra por debajo del tercer percentil (-2SD). Anomalías en el crecimiento raramente son

detectadas antes de esta edad (Pombo y Castro-Feijóo, 2005; Cañete Estrada y Gil Campos, 2009; Cañete et al, 2015).

La velocidad de crecimiento es uno de los parámetros más sensibles para determinar alguna anomalía en el crecimiento de un niño.

Además de la talla baja, los niños tienden a compartir un fenotipo similar con independencia de la etiología de la enfermedad: cara pequeña, abultamiento de la frente, raíz nasal plana, y la circunferencia de la cabeza normal, generalmente proporcionada. Este aspecto es descrito a menudo como cara de “muñeca” o “querubín”. Ocasionalmente el incisivo central único junto con talla baja puede ser signo de sospecha (Pombo y Castro-Feijóo, 2005; Cañete Estrada y Gil Campos, 2009; Cañete et al, 2015).

Estos pacientes tienden a tener sobrepeso moderado en cuanto a su talla; el desarrollo muscular es escaso y hay acumulación de grasa en el tronco. Manos y pies pequeños, uñas poco desarrolladas. La dentición tiende a retrasarse (Choi et al, 2017; Partyka et al, 2018), y la voz es a menudo aguda. El cabello es escaso y fino, y el paciente muestra falta de apetito. En los niños que no reciben tratamiento, el estirón de crecimiento puberal tiende a retrasarse, lo cual en cierta medida favorece la talla (Pombo y Castro-Feijóo, 2005; Cañete Estrada y Gil Campos, 2009; Cañete et al, 2015; Vyas et al, 2017).

Hallazgos auxológicos anormales son la mejor guía para decidir si un niño requiere investigación adicional. La prueba de estimulación de la GH continúa desempeñando un papel clave en el diagnóstico de déficit, pero los valores de aquella pueden variar significativamente con la prueba de estimulación que se efectúe y el ensayo utilizado, creando una dificultad añadida para el diagnóstico. De igual manera, un falso positivo conducirá a muchos años de inyecciones diarias subcutáneas (SC), gasto importante y la exposición innecesaria a los efectos adversos potenciales o por el contrario un falso negativo puede privar de un tratamiento necesario. Asimismo la reproductibilidad no es exacta (Vyas et al, 2017).

Después del periodo neonatal, la medición de las concentraciones de GH sérica de forma aleatoria no tiene ningún valor clínico debido a su secreción pulsátil. Como la mayoría de los pulsos ocurren durante la noche, durante el día se podría obtener una muestra con valor 0 ng/mL que no es significativo de déficit. De lo que se deduce que las pruebas de provocación de la secreción de la GH mediante estímulos fisiológicos/farmacológicos son necesarios para diagnosticar DGH, aunque en la actualidad es controvertido y está en discusión. Han sido desarrollados, al menos, 34 test de estímulo de secreción de GH, aunque los más usados en Europa son la hipoglucemia insulínica, arginina y glucagón más beta-bloqueantes (Rochioccioli y Tauber, 1994; Binder, 2011; Vyas et al, 2017).

Tras numerosos estudios se ha definido el punto de corte a 7.3 ng/mL, aunque otros centros utilizan un punto de corte de 7 ng/mL utilizando técnicas de espectrometría de masas (Binder, 2011; Binder et al, 2011; Wagner et al, 2014; Cañete et al, 2015).

Recientes estudios de DGH orgánico llegan a la conclusión que los puntos de corte para el test con arginina, tolerancia a la insulina y con clonidina, son 6.5 ng/mL, 5.1 ng/mL y 6.8 ng/mL respectivamente (Guzzetti et al, 2016).

Algunos de estos test no están exentos de efectos adversos como somnolencia, hipotensión e incluso muerte en la hipoglucemia insulínica (Shah et al, 1992).

Ante tanta complejidad para la valoración de la GH, la espectrofotometría de masas ofrece un futuro prometedor, aunque aún no está disponible en la práctica diaria y no todos los centros tienen acceso a ella (Arsene et al, 2014; Krishnamurthy et al, 2018).

Spiliotis et al (1984), describieron la disfunción neurosecretora de la GH en un grupo de niños con criterios auxológicos similares a los DGH, pero con pruebas de estímulo de GH normales y obtenían además una secreción baja de GH en 24h con niveles bajos de IGF-1, reducción del número de pulsos de GH y de su la amplitud.

Como alternativa a las pruebas de estimulación, se comenzó a evaluar la secreción de la GH fisiológica mediante perfiles de 12 o 24 h nocturnas. Sin embargo, ésta no está exenta de limitaciones, pues requiere el ingreso hospitalario durante la noche o el día y la noche y la toma de muestras de sangre cada 20 minutos, teniendo poca sensibilidad y en la actualidad tiende a ser abandonada (Andersen, 2015). Además, las concentraciones de IGF-1 en suero varían con la edad y, sus concentraciones se encuentran reducidas en niños con malnutrición, hipotiroidismo, enfermedades crónicas, insuficiencia renal crónica y diabetes (Andersen, 2015).

1.2.1.1. Pruebas de imagen

Se precisa de una imagen por RM del hipotálamo-hipófisis en todos los pacientes en los que se confirme DGH, así como en aquéllos en los que hay conocimiento o sospecha de tumores intracraneales, hipoplasia del nervio óptico/displasia septo-óptica u otras anomalías relacionadas con el desarrollo neuronal. La presencia de una anomalía en el eje hipotálamo-hipófisis se puede considerar como una prueba para el diagnóstico de DGH (Dumrongpisutikul et al, 2018).

El hallazgo radiológico más común es una combinación variable de una glándula pituitaria posterior ectópica, hipoplasia pituitaria anterior y un tallo pituitario delgado o interrumpido (Murray et al, 2016; Dumrongpisutikul et al, 2018) (Figura 3).



Figura 3. Reproducción RM del eje hipotálamo-hipófisis de un niño con neurohipófisis ectópica (Cortesía Dr. Cañete).

Otras anomalías asociadas con el DGH hipotálamo-hipofisario incluyen tumores, como el craneofaringioma (Figura 4), displasia septo-óptica, hipoplasia/agenesia del cuerpo calloso, holoprosencefalia, engrosamiento tallo pituitario y la presencia de una silla turca vacía (Murray et al, 2016; Xu et al, 2017).

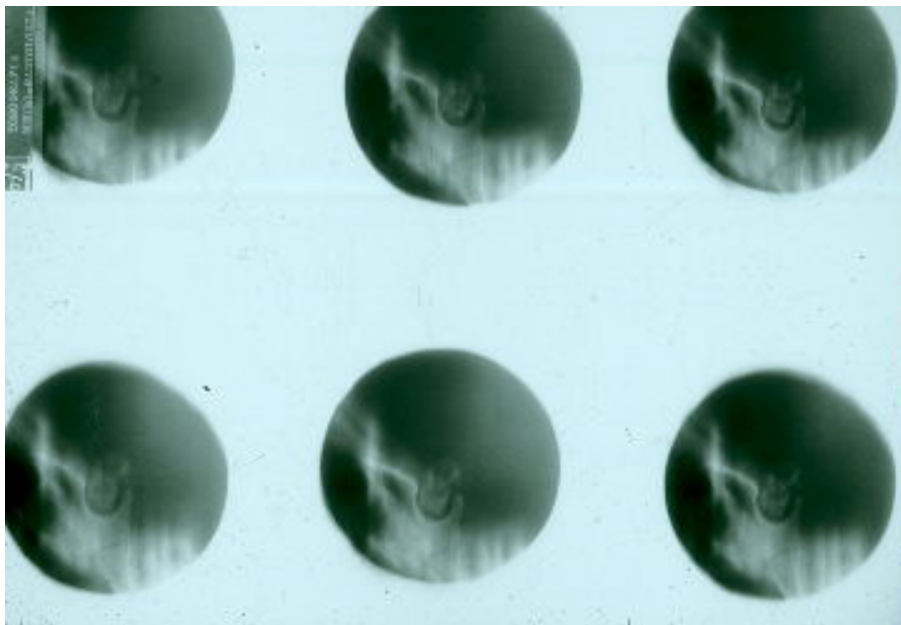


Figura 4. Corte de radiografía lateral de la silla turca. Calcificación intrasellar por craneofaringioma (Cortesía del Dr. Cañete).

Tal vez, las imágenes obtenidas por RM del eje hipotálamo-hipófisis en pacientes con esta patología deben ser de elección, aunque no ofrece ninguna información sobre la función de la hipófisis. Esta técnica contribuye al diagnóstico topográfico de neurohipófisis ectópica (Figura 3) o lesiones estructurales (Figura 4).

1.2.1.2. Estudio genético

Un porcentaje no desdeñable de los DGH son debidos a mutaciones en los genes implicados en la síntesis o secreción de la GH (Sundralingam et al, 2017; Galli-Tsinopoulou et al, 2018). Por este motivo, las pruebas de diagnóstico deben incluir la búsqueda de delecciones o mutaciones en los genes para GH de la hipófisis, factores de transcripción específicos de la pituitaria 1 (Pit 1), “profeta del Pit-1” (PROP1), POU1F1, factor de transcripción HESX 1, receptor de GH (GHR), receptor GHRH (GHRHR) y IGFs, especialmente cuando hay signos sugestivos o se acompañan de déficit múltiples hipofisario (Birla et al, 2016a, b; Murray et al, 2016;Galli-Tsinopoulou et al, 2018; Tóke et al, 2018).

1.2.1.3. Criterios auxológicos

El diagnóstico del DGH no sólo se basa en criterios auxológicos (anteriormente comentados) sino también en hallazgos endocrinológicos, radiológicos y genéticos, ya que se trata de un síndrome que comprende varias condiciones de etiopatogenia diferente, que pueden agruparse en tres categorías: alteraciones de la secreción de GH, siendo esta menor o nula, alteraciones en la secreción de su efector, el IGF-1 y alteraciones en su acción periférica a través de este efecto. No hay que olvidar que antes de plantear el DGH en un niño se deben de excluir todas las posibles causas de déficit y de talla baja (Cañete et al, 2015) (Tabla 1).

1.2.1.4. Examen radiológico

Se debe comenzar con una radiografía de mano y muñeca izquierda, permitiendo la evaluación de la maduración ósea utilizando el método “Greulich and Pyle” o “TW2-RUS o TW3-RUS” (Anderson, 1971); puede existir un retraso de la maduración de 1 año o más con respecto a la edad cronológica. Una radiografía lateral de cráneo o tomografía central selectiva de la silla turca pueden proporcionar información sobre la glándula pituitaria y la existencia de calcificaciones, entre otras (Nielsen et al, 2015).

En los últimos años, se han elaborado varias guías para el diagnóstico (comentado en párrafos anteriores) y tratamiento del DGH (Growth Hormone Research Society, 2000; Cohen et al, 2008; Cañete et al, 2015; Poyrazoğlu et al, 2015; Murray et al, 2016).

1.2.1.5. Diagnóstico endocrinológico

El diagnóstico endocrinológico, se basan en las pruebas de estimulación de la GH (anteriormente comentadas), muy discutidas y por muchos puestos en cuestión.

Los límites de los que puede considerar normalidad, insuficiencia y DGH muchas veces no son claros. Las pruebas para la medición de GH deben reunir precisión, exactitud y reproducción con referencia a un estándar y además tiene que tener gran sensibilidad y especificidad (Nielsen et al, 2015).

Se postula para establecer el diagnóstico de DGH deben ser patológicas dos de estas pruebas, excepto en los recién nacidos, en los que sólo una determinación en la hipoglucemia espontánea con pico de GH < de 7ng/mL (Rochioccioli y Tauber, 1994).

Como ya se ha comentado anteriormente, los límites de corte de las pruebas de estimulación de GH para diagnosticar el DGH en niños y adolescentes no están suficientemente validados por estudios clínicos debido a discrepancias en el rendimiento de los inmunoensayos de GH y la falta de poblaciones de estudio disponibles. El punto de corte en 7.3 ng/mL, es el pico máximo aceptado actualmente por las diferentes Sociedades Científicas (Binder, 2011; Binder et al, 2011; Chesover y Dattani, 2016).

El *priming* con esteroides sexuales en las pruebas de estimulación para el diagnóstico de DGH es aún objeto de debate. La mayoría de los datos sobre su utilidad durante la estimulación de GH hasta el momento parecen apoyar su uso en el diagnóstico en la infancia. Hay tendencia a tratar el retraso del crecimiento y desarrollo tras una prueba con impregnación previa de esteroides sexuales, sin embargo, hay estudios que ponen esta decisión en cuestión. Así, por ejemplo, la administración de estrógenos en niñas prepuberales resultó en un aumento de la GH entre 1.9-20.3 µg/L a 7.2–40.5 µg/L (Marin et al, 1994). Otro estudio realizado sobre niños prepuberales o en pubertad temprana con baja estatura, velocidad de crecimiento inferior 4 cm/año y que fallaron con los test de provocación de la GH fueron divididos en 2 grupos, uno usando la dosis baja de testosterona y otro a la dosis convencional. Al repetir la prueba, alcanzaron valores de GH >10 µg/L, el 54% y 60% respectivamente (Gönç et al, 2001).

En el momento actual no existe consenso sobre el uso de *priming* con esteroides sexuales antes de las pruebas de provocación (Gonc et al, 2011; De Sanctis et al, 2014; Soliman et al, 2014; Chesover y Dattani, 2016; Chinoy y Murray, 2016; Murray et al, 2016; Vyas et al, 2017). La Sociedad de Endocrinología Pediátrica, en la última actualización de las guías sobre el diagnóstico y el tratamiento del DGH, recomienda que en niños y niñas prepuberales mayores de 11 y 10 años de edad respectivamente se sometán al *priming*, principalmente si su talla genética o diana está dentro de -2 SD de la media de la población de referencia. El *priming* con esteroides sexuales reduce la posibilidad de realizar un diagnóstico erróneo del DGH (Grimberg et al, 2016). Tanto en niños como en niñas se puede utilizar la tarde previa a la prueba 1-2 mg de valerato de estradiol. Como alternativa, en niños, se puede utilizar testosterona intramuscular en dosis entre 50 y 100 mg una semana antes de la prueba (Grimberg et al, 2016; Vyas et al, 2017).

El estudio endocrinológico se debe de iniciar midiendo niveles de IGF-1 e IGFBP-3, ambos factores GH dependientes y que además sirven para el estudio de los trastornos del receptor de hormona de crecimiento en el hígado (Vyas et al, 2017; Blum et al, 2018).

1.3. Tratamiento con GH en niños con DGH

El objetivo principal del tratamiento con GH en el DGH es conseguir la normalización de la talla durante la infancia, alcanzando una talla normal en la edad adulta y similar a la edad genética o diana.

Este aumento en la velocidad de crecimiento y talla adulta final, está influenciada por diversos factores: edad de inicio del tratamiento, grado de maduración ósea, retraso del crecimiento estatural, respuesta alcanzada durante la pubertad, y por supuesto, factores genéticos (Polak et al, 2018).

En la actualidad es de elección la GH humana obtenida mediante bioingeniería genética recombinante del ADN (rhGH). Este método da lugar a una hormona polipeptídica de 191 aminoácidos, que es igual a la humana (Cappa et al, 2016; Growth Hormone Research Society, 2000).

Se administra en forma de inyección subcutánea (SC), diaria y por la tarde-noche, antes de acostarse, imitando de esta forma la secreción fisiológica de la GH que se produce principalmente durante el sueño y aumentando así su absorción.

Existen diversos trabajos que han probado la eficacia mayor de la administración de la GH a diario, en relación a otras frecuencias de administración (Jørgensen et al, 1990; Bajpai y Menon, 2005).

Actualmente se tiende a expresar en dosis en miligramos por Kg y día, debiendo tener consideraciones especiales en niños obesos. El rango de dosis recomendado para tratar el déficit y con el que se ha demostrado una relación dosis-repuesta en los 2 primeros años en términos de velocidad de crecimiento es: de 0,025 a 0,035 mg/Kg/día, con dosis más habitual 0.03 mg/kg/día (Growth Hormone Research Society, 2000; Cañete et al, 2015; Novo Nordisk, 2015; Murray et al, 2016). En numerosos estudios se ha visto que el uso de una dosis superior podría tener un mayor impacto negativo en el metabolismo de la glucosa, así como de la función tiroidea, pudiendo relacionarse con efectos no deseados (Xue et al, 2016).

Actualmente están en fase de desarrollo hormonas de crecimiento de acción prolongada que mejoran la tolerabilidad y adherencia al reducir el número de inyecciones, aunque serán necesarios registros a largo plazo que evalúen la eficacia y seguridad de estas preparaciones (Yuen et al, 2018).

Una vez iniciado el tratamiento, la dosis instaurada inicialmente puede ser modificada a *posteriori*. Es por ello que, de forma rutinaria se deben realizar revisiones y controles por el es-

pecialista (de 3 a 6 meses) para determinar la repuesta al tratamiento mediante la monitorización de la talla y la velocidad de crecimiento, expresados como SD por año. Además, se deben realizar de forma periódica al menos una vez al año, determinaciones en sangre de IGF-1 e IGFBP-3, TSH y T4 libre, FSH, LH, testosterona en los niños, estradiol en las niñas, y edad ósea, para valorar tanto cumplimiento terapéutico, como la seguridad del fármaco, debiéndose mantener sus niveles en el rango de la normalidad ($<+ 2$ SD según edad y sexo) (Blum et al, 2018).

Existen múltiples estudios que ayudan a predecir la respuesta al tratamiento con la hormona mediante el uso de fórmulas matemáticas y modelos de predicción de respuesta (Vosahlo et al, 2004; Bajpai y Menon, 2005; Dahlgren et al, 2007; Cutfield y Lundgren, 2009; Lechuga-Sancho et al, 2009; Audí et al, 2013; Smyczynska et al, 2013; Duchén et al, 2017; Migliaretti et al, 2018).

Cuando la respuesta es insuficiente o bien disminuye de manera inesperada, conviene replantear el diagnóstico y pensar en otras causas del retraso como: mal cumplimiento del tratamiento o la presencia de enfermedad intercurrente que estimula el catabolismo de la hormona y además hay niños mal respondedores (Acerini et al, 2017). En un estudio llevado a cabo en niños presentando distintos trastornos del crecimiento, se comunicó un crecimiento sub-óptimo en un tercio de estos, asociándose con una mala adherencia al tratamiento (De Pedro et al, 2016; Bagnasco et al, 2017).

1.4. Adherencia al tratamiento de la GH

La efectividad de cualquier tratamiento farmacológico depende en gran medida de la adherencia que tenga el paciente hacia éste. Una de las causas de fracaso en el tratamiento, se debe a la falta de adherencia o a la no persistencia en el régimen prescrito (Lass y Reinehr, 2015; Loche et al, 2016).

En esta línea habría que definir los conceptos de persistencia y adherencia al tratamiento terapéutico. Persistencia: se define como la medida de cuánto tiempo continúa el paciente utilizando la terapia prescrita. Esta también se cuantifica como el porcentaje de los pacientes que continúan utilizando la terapia prescrita después de un periodo específico basado en la receta y las recargas (Rosenfeld y Bakker, 2008; Dilla et al, 2009).

Adherencia: en el año 2003, la Organización Mundial de la Salud (OMS), definió el término adherencia como “el grado en el que la conducta de un paciente, en relación con la toma de la medicación, el seguimiento de una dieta o la modificación de hábitos de vida, se corresponde con las recomendaciones acordadas con el profesional sanitario” (Dilla et al, 2009). Los rangos de cumplimiento en general, en términos de tratamientos de larga duración, oscilan entre el 50% y el 54% (Burkhart y Sabaté, 2003; Rosenfeld y Bakker, 2008).

La necesidad de inyecciones subcutáneas (SC), de aplicación diaria, puede agravar la adherencia al tratamiento porque las terapias inyectables son percibidas como dolorosas y de difícil administración. Para lograr un buen comportamiento de adherencia es necesaria la planificación de un tratamiento eficaz y eficiente. Por esta razón es muy importante que los dispositivos utilizados para la administración sean de uso fácil (Rohrer et al, 2017).

La evolución tecnológica ha evolucionado desde las primitivas jeringuillas con aguja a las plumas precargadas y finalmente dispositivos sin aguja. Con independencia de la edad, se ha comunicado que la adherencia al tratamiento es mucho mayor en aquellos pacientes que se autoinyectan y utilizan algún dispositivo automático vs aquéllos que utilizan jeringas tradicionales o pre-cargadas (Spoudeas et al, 2014).

La falta de adherencia al tratamiento repercute directamente en un crecimiento de los costes y una reducción de los resultados deseados (Cutfield et al, 2011). Los resultados del estudio observacional donde se evaluó la adherencia a la GH en pacientes tratados mediante un dispositivo de inyección totalmente automatizado y electrónico (easypod™), para monitorizar el tiempo, la fecha y la dosis administrada. Los pacientes monitorizados eran niños diagnosticados de DGH o PEG. La adherencia media a los 12 meses de monitorización fue del 92.3%, relacionándose inversamente con la edad y la duración del tratamiento (Arrabal Vela et al, 2018).

Sin embargo, en otro estudio realizado en niños y adolescentes con DGH, en un estudio a los que se les pasó la escala Morisky de 8 ítems para medir la adherencia al tratamiento con GH, donde se registró una baja adherencia al tratamiento, 56,7% y el 57,9% de los niños y adolescentes respectivamente (Mohseni et al, 2018).

1.5. Tratamiento con biosimilares de la GH

De acuerdo a la EMEA (*European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)*, (2006), se define un biosimilar como:

1. Un medicamento que es similar a un medicamento biológico ya autorizado (“medicamento biológico de referencia”)
2. La sustancia activa de un medicamento biosimilar es similar al del medicamento biológico de referencia.
3. El biosimilar y el medicamento biológico de referencia se utilizan, en general, en la misma dosis para tratar la misma enfermedad.
4. Desde que el biosimilar y el medicamento biológico de referencia son similares, pero no idénticos, la decisión de tratar un paciente con el referente o con el biosimilar debe realizarse siguiendo la opinión de un profesional sanitario cualificado.

La regulación para la aprobación de biosimilares es un proceso más complicado que para la aprobación de un genérico de un fármaco tradicional, derivada, no sólo del proceso de fabricación, sino también del propio agente medicamentoso (biofármaco), relacionados con

la estructura y el mayor peso molecular que el de un fármaco tradicional (Meredith, 2009; Declerck et al, 2010).

En 2006, recibieron la aprobación de comercialización los 2 primeros productos biosimilares de la GH en la Unión Europea, Omnitrope y Valtropin. Ambos productos cumplieron los requerimientos de aprobación para los biosimilares conteniendo rhGH, tal y como se estipula por la EMEA (Peterkova et al, 2004; Peterkova et al, 2007; Romer et al, 2007; Declerck et al, 2010).

En un estudio de seguridad y efectividad a largo plazo con onmitrope, éste demostró que es eficaz, seguro y se tolera bien (Lughetti et al, 2016). Presentando unas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas similares al producto de referencia (Toffoletto et al, 2016). Otro estudio evaluó la satisfacción de los pacientes al cambio de tratamiento del tratamiento con GH marca a biosimilar. Mostrando una reducción de los costes, y manteniendo un perfil de seguridad óptimo (Van Vlijmen et al, 2017).

Actualmente, están en desarrollo clínico preparados de GH de acción prolongada (administración semanal, bisemanal e incluso mensual). Siendo una nueva opción de tratamiento, que podrían mejorar el cumplimiento terapéutico y el perfil de seguridad del fármaco, con resultados iniciales prometedores (Doknic et al, 2014; Christiansen et al, 2016; Saenger y Mejia-Corletto, 2016; Yuen et al, 2018).

Se ha establecido que el tratamiento con GH se debe prolongar en las niñas hasta alcanzar una edad ósea a los 14 años y en los niños a los 15 años, aunque sería aconsejable prolongarlo algún tiempo más al objeto de conseguir el pico máximo de masa ósea normal (Cañete Estrada y Gil Campos, 2009). Sin embargo, numerosos estudios realizados en los últimos años, han abierto nuevas y amplias perspectivas para la continuación del tratamiento durante toda la vida, buscando ya no el crecimiento estatural sino los efectos metabólicos beneficiosos de esta hormona (Cañete Estrada y Gil Campos, 2009; García-Martínez et al, 2009).

Actualmente el tratamiento con GH parece bastante seguro. Existen distintas bases de datos (KIGS y GeNeSIS) que concluyen que la terapia con GH es segura. Aunque los efectos a largo plazo están por determinar (Halac y Zimmerman, 2004; Cappa et al, 2016).

1.6. Efectos adversos del tratamiento con GH

Los efectos secundarios más comunes, aunque excepcionales son: retención líquida, edema en las extremidades, síndrome del túnel carpiano, artralgias y mialgias. Estos síntomas se resuelven rápidamente con la reducción de la dosis y desaparecen totalmente tras la retirada del tratamiento (Clayton y Cowell, 2000). Sin embargo, cefaleas, hipertensión intracraneal benigna o pseudotumor *cerebri* se ha relacionado con el tratamiento con GH, más en niños y es raro en adultos. Si presenta papiledema regresa tras el cese del tratamiento. También desplazamiento de la epífisis femoral, la posibilidad de manifestar escoliosis debe ser explorada en

Los niños en pubertad, aunque no existe evidencia de que se deba directamente a la GH (Carel y Butler, 2010).

En los pacientes con factores de riesgo pre-existentes de diabetes y cáncer, la administración de GH se debe realizar con precaución y debe estar monitorizada (Stochholm y Kiess, 2018).

No se ha comprobado que tenga mayor incidencia procesos oncohematológicos.

Las radiaciones, cuando se utilizan para tratar tumores sólidos en el cerebro y como profilaxis de la leucemia, pueden causar un funcionamiento anormal del eje hipotálamo-hipófisis (Jarfelt et al, 2004; Galleto et al, 2014; Lo et al, 2016). Se estima una incidencia entre 20-80% de DGH tras una irradiación corporal total y trasplante de células madre hematopoyéticas. Se deben tratar con GH a todos los niños que hayan recibido régimen de quimioterapia muy intensivo con o sin radiación en el Sistema nervioso central (SNC). La dosis depende principalmente de la edad y tejido irradiado (Claude y Laprie, 2015).

1.7. Periodo de transición de la infancia a adultos

La fase de transición, se define como el período entre mediados y finales de la adolescencia hasta 6-7 años después de la consecución de la talla final. Representa un momento crucial para la reevaluación de la secreción de GH para decidir si el tratamiento con ésta se debe continuar durante toda la vida. Se carece de directrices basadas en la evidencia para el diagnóstico y tratamiento de los niños con deficiencia de hormona de crecimiento durante la transición (Inzaghi y Cianfarani, 2013; Alvarez-Escolá et al, 2014; Cañete et al, 2015; Cappa et al, 2015; Ahmid et al, 2016a, b; Hauffa et al, 2017; Meazza et al, 2017).

Algunos estudios postulan que los niños tratados con GH, especialmente aquellos pacientes con DGH secundario a alteraciones estructurales del eje hipotálamo-hipófisis, mejoran su perfil lipídico y su densidad mineral ósea (DMO) (Rota et al, 2008; Bazarra-Castro et al, 2012; Courtillot et al, 2013; Aimaretti et al, 2015; Ahmid et al, 2016a, b).

La reevaluación de estos pacientes en el periodo de transición se debe hacer con secretagogos potentes (como, el test de tolerancia a la insulina (TTI) o arginina-GHRH), utilizando puntos de corte más estrictos (por ejemplo < 6ng/mL para el TTI en ese grupo de edad), individualizando de esta forma, el correcto tratamiento con GH durante este periodo de tiempo (Mauras, 2010).

Para ello es imprescindible la estrecha colaboración entre pediatras y endocrinólogos de adultos para una perfecta organización que debe ser construida basándose en tradiciones locales, experiencia y consideraciones geográficas (Hauffa et al, 2017).

1.8. Tratamiento con GH en el niño con procesos hemato-oncológicos

La GH puede producir crecimiento de células normales y malignas. La posibilidad de que esta pueda inducir al desarrollo de cáncer, en particular en aquellas personas con predisposición a

desarrollar neoplasias, ha dado lugar a ciertas consideraciones acerca de su uso (Ogilvy-Stuart y Gleeson, 2004; Jenkins et al, 2006).

Sin embargo, estudios de seguimiento en amplias muestras de pacientes pediátricos indican que el tratamiento con GH no se asocia con un riesgo aumentado de aparición o recurrencia de cáncer (Child et al, 2016).

La mayoría de estos estudios, donde evaluaron el riesgo de neoplasia de novo en pacientes sin antecedentes de cáncer y que recibieron tratamiento con GH durante la infancia, no mostraron un aumento del riesgo durante el tratamiento o seguimiento post-tratamiento (Wilton et al, 2010).

Sin embargo, en 2002, Swerdlow et al, en una cohorte de 1.848 pacientes tratados previamente con GH de cadáver, mostró una significancia estadística para el cáncer colon-rectal, basada en 2 casos (Swerdlow et al, 2002).

Posteriormente, los resultados de varios estudios han mostrado que las tasas de nuevos casos de cáncer en pacientes sin factores de riesgo no son significativamente mayores que las tasas esperadas en la población general (Bell et al, 2010; Wilton et al, 2010; Stochholm y Kiess, 2018).

Existe controversia en cuanto al incremento de la recurrencia o predisposición de un segundo tumor. Algunos estudios no muestran una asociación entre el tratamiento con GH y un aumento en la recurrencia o predisposición a un segundo tumor (Swerdlow et al, 2000; Bell et al, 2010; Wilton et al, 2010). Sin embargo, otros estudios señalan que existe un aumento del riesgo de segunda neoplasia, especialmente en pacientes con tumor del sistema nervioso central y que han recibido radiación como terapia (Sklar et al, 2002; Ergun-Longmire et al, 2006; Stochholm y Kiess, 2018).

1.9. Indicaciones del tratamiento con GH

Actualmente, la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos tiene aprobadas diez indicaciones para tratamiento de talla baja con rhGH: déficit de GH (DGH), síndrome de Turner, Insuficiencia Renal Crónica en niños prepuberales (IRC), síndrome de Prader-Willi, niños nacidos pequeños para la edad gestacional (PEG), talla baja secundaria a alteraciones del gen SHOX, SIDA, talla baja idiopática, síndrome de intestino corto (SIC) y síndrome de Noonan.

En España, la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) ha permitido su uso en aquellos casos cuya efectividad ya había sido probada. Las indicaciones vigentes en nuestro país son para todas las Comunidades Autónomas, y las admitidas también la Agencia Europea del Medicamento (EMA) (Takeda et al, 2010; Castro-Feijóo et al, 2015). Estas son: DGH, síndrome de Turner, Insuficiencia Renal Crónica (IRC), síndrome de Prader-Willi, pequeño para la edad gestacional (PEG) y deficiencia de crecimiento debida a alteración en el gen SHOX (Loche et al, 2014).

1.10. Acciones de la hormona de crecimiento (GH)

1.10.1. Introducción

La GH no actúa en un determinado órgano diana de forma específica, sino que sus acciones son ejercidas sobre todo el organismo (función pleiotrópica), no sólo de forma endocrina, sino también auto y paracrina. Aunque su acción principal y más conocida es la relacionada con el crecimiento lineal, esta hormona interviene de forma endocrina en regulaciones metabólicas nutricionales y también de forma auto y/o paracrina en procesos de proliferación y diferenciación celular. Por esta razón la GH es algo más que una hormona de crecimiento somático (Yoo et al, 2015; Ahmid et al, 2016a, b).

Se une a su receptor específico (GHR), el cual está presente en la mayoría de las células del organismo. Las acciones biológicas de la GH se pueden englobar en dos grupos: aquéllas de tipo directo, que no necesitan mediadores y aquéllas que son denominadas indirectas y necesitan la mediación de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs). En general, las acciones directas son las que ejerce sobre el metabolismo lipídico e hidrocarbonado. Su acción principal, la estimulación del crecimiento, la realiza fundamentalmente de forma indirecta, a través del IGF-1 (Mohan y Kesavan, 2012; Lindsey y Mohan, 2016).

La GH tiene un papel decisivo en el crecimiento y el desarrollo postnatal (Córdova Martínez, 2003), pero además una gran cantidad de efectos metabólicos que se mantienen durante toda la vida.

También los factores de crecimiento dependientes de GH, actúan de forma paracrina o autocrina en muchos tejidos, para regular la replicación celular y el crecimiento. Favorecen también la diferenciación de las células de origen mesodérmico: condroblastos, mioblastos y células eritroides (Argente et al, 2000a)

Muchos de estos efectos son dependientes de la edad. Así, por ejemplo, los pacientes con DGH presentan una reducción de la DMO 4 veces mayor durante el crecimiento pospuberal que en el prepuberal (Richard y Subburaman, 2015).

La GH también tiene acciones propias directas ejercidas sobre las células del cartílago de unión, en el cual estimula la multiplicación y la diferenciación de las células precursoras de los fibroblastos, para formar precondrocitos y condrocitos sobre los que actúa posteriormente el IGF-1 (Wu et al, 2015).

De forma general, la GH aumenta el crecimiento del esqueleto, músculo, tejido conectivo y vísceras. Además, modifica la composición del suero (elevando glucosa, fósforo y ácidos grasos) y de la orina (produciendo calciuria y disminuyendo el nitrógeno, potasio y fósforo). Asimismo, es la única hormona adenohipofisaria que no actúa de forma específica sobre glándulas diana de nuestro organismo, sino que sus acciones van dirigidas a todos o casi todos los tejidos de la economía (Argente et al, 2000a; Rothermel y Reinehr, 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Acciones de la GH.

Crecimiento longitudinal. Acciones directas e indirectas
Acciones estimulantes sobre el crecimiento y la división celular de otros tejidos
GH y metabolismo de los hidratos de carbono (glucosa, glucógeno)
GH y metabolismo de los lípidos (lipólisis)
GH y metabolismo de las proteínas
GH y riñón. Natriuresis. Calcio, nitrógeno, fósforo. Potasio
GH y agua corporal
GH y composición corporal. Acciones sobre la grasa corporal y sobre el músculo
GH y factores de riesgo cardiovascular
GH y Lípidos.
GH y trastornos de la hemostasia
GH y endotelio. placas de ateroma
GH e inflamación
GH y grelina (ghrelina)
GH y leptina
GH y adiponectina
GH y otras adipoquinas
GH y síndrome metabólico
GH y esteroides sexuales. Reproducción
Acciones de la GH sobre órganos
Acciones de la GH sobre el corazón
Acciones de la GH sobre el ojo (retina y córnea)

GH: hormona de crecimiento

1.10.2. Crecimiento longitudinal. Acciones directas e indirectas

Son varias las hormonas que interviene en el crecimiento longitudinal postnatal, siendo la más importante la GH (Dobie et al, 2015; Tritos y Klibanski, 2016).

Aunque la IGF-1 circulante es producida ampliamente por el hígado, ésta es expresada por células de todos los tipos de tejidos, incluyendo osteoblastos y condrocitos (Yakar et al, 2018). La expresión de IGF-1 en el cartílago juega un papel fundamental en el desarrollo óseo. La interrupción de la IGF-1 en los condrocitos resultó en una reducción en la longitud y grosor de los huesos y DMO. En esta línea, la IGF-1 específica de condrocitos es necesaria para la correcta organización y función de la placa de crecimiento. Estos efectos se han visto en ratones, donde la sobreexpresión de GH incrementa la DMO y en humanos, donde la aparición en la infancia de DGH lleva a una disminución de la DMO y aumento del riesgo de fracturas en la edad adulta (Kuzma and Payer, 2010; Improda et al, 2016)

En pacientes con insensibilidad a la GH, la administración de IGF-1 puede estimular el crecimiento longitudinal de los huesos, aunque no puede compensar la inexistencia de sus efectos. Además, la GH en sinergia con la IGF-1 produce mayores efectos que cada una de forma aislada (Lindsey y Mohan, 2016).

Además de la promoción del crecimiento lineal, la GH tiene acciones pleiotrópicas que han sido recientemente analizadas por un grupo de expertos, tanto en niños como en adultos, en el que establecen nuevos marcadores sensibles a la GH (Johannsson et al, 2018).

1.10.3. Acción sobre el músculo

La función muscular está regulada por muchos factores, entre los que destacan: genes, estado nutricional, estilo de vida y hormonas, como, la GH, hormona tiroidea, testosterona y glucocorticoides que ejercen efectos importantes sobre su crecimiento y actividad. En el músculo existe una tasa de equilibrio entre la degradación y síntesis de proteínas. Se piensa que este estado podría verse afectado por el eje GH/IGF-1. En esta línea, es conocido que la masa muscular se reduce en adultos con DGH, lo que sugiere que puede existir una alteración subyacente del metabolismo proteico en estos pacientes. El efecto anabólico de la GH podría estar mediado además por el IGF-1, producido principalmente en el hígado, aunque también de forma local en el músculo. El IGF-1 aumenta el anabolismo proteico, mediante la reducción de la tasa de proteólisis.

Russel-Jones et al (1998), observaron un aumento de la síntesis proteica y una reducción en la oxidación, sin cambios en la degradación de proteínas tras 2 meses de tratamiento con GH en pacientes con DGH.

Estos efectos anabólicos también se observaron en adultos sanos tratados con GH (Horber y Haymond, 1990) y tras 6 meses de tratamiento (Binnerts et al, 1992).

Así la GH regula el anabolismo de las proteínas mediante mecanismos endocrinos y paracrinicos, tanto dependientes como independientes de la IGF-1. Su efecto en todo el metabolismo proteico consiste en el aumento de la síntesis y la disminución proteica a través del estrés oxidativo.

Se ha comprobado que el tratamiento con GH mejora la salud osteomuscular en niños deficientes de GH (Improda et al, 2016). A corto plazo, tras tres meses, el tratamiento con GH en adultos con DGH modifica la composición corporal con disminución de la masa grasa, aunque no mejora sustancialmente la capacidad de ejercicio, si aumenta la función mitocondrial (González et al, 2018).

Como conclusión, la GH aumenta la masa muscular, para lo cual necesita la presencia de hormonas colaterales como la insulina y las hormonas sexuales (Chikani y Ho, 2014; Lanes, 2016).

1.10.4. GH y riñón. Natriuresis. Calcio, nitrógeno, fósforo y potasio

El DGH se asocia con una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) y flujo renal plasmático, junto con niveles bajos de agua y sodio. El tratamiento de re-emplazo con GH o IGF-1 normaliza parcialmente estos parámetros. Dosis superiores a estas pueden resultar en

una retención de líquidos con significación clínica, manifestándose en forma de edema, ganancia de peso (Kamenicky et al, 2014).

También actúa sobre el metabolismo fosfocálcico, en combinación con la hormona paratiroidea (PTH), favoreciendo un aumento del calcio y fósforo en plasma y los depósitos de éstos en el hueso.

Varios componentes del eje GH/IGF-1, incluyendo GHR, IGF-1, receptor de IGF-1 y IGFBPs se expresan en el riñón con efectos sobre su crecimiento, hemodinámica glomerular y reabsorción tubular de agua, sodio y fosfatos (Feld y Hirschberg, 1996; Córdova Martínez, 2003; Anil et al, 2011).

Se ha comprobado efectos beneficiosos del tratamiento con GH en niños con raquitismo hipofosfatémico familiar ligado al X (Cañete et al, 2014a; Meyerhoff et al, 2018)

1.10.5. GH y composición corporal

El tratamiento sustitutivo con GH en DGH aumenta la proporción de masa magra y reduce la grasa corporal, mejorando la fuerza muscular (Cornier et al, 2011). El aumento de grasa visceral es un marcador de riesgo cardiovascular (Cornier et al, 2011; Capalbo et al, 2017).

La medida de la circunferencia de la cintura se recomienda como herramienta clínica para identificar exceso de grasa visceral para identificar pacientes en riesgo potencial.

En un estudio realizado en niños prepuberales con DGH presentaron mayor perímetro de cintura y de cintura-cadera que los controles, sugiriendo mayor grasa visceral. El tratamiento con GH durante 2 años redujo dicha proporción, mejorando la composición corporal (Argente et al, 2000a; Capalbo et al, 2014; De Leonibus et al, 2016; Stewart et al, 2016).

1.10.6. GH y metabolismo de los hidratos de carbono (glucosa y glucógeno)

La GH tiene un efecto ahorrador de glucosa en todo el organismo, lo que conlleva a una elevación de la glucemia, puesto que la utilización de la glucosa por las células para la obtención de energía disminuye de forma provisional, aumenta la síntesis de glucógeno (gluconeogénesis hepática y muscular), y estimula de forma secundaria, por su efecto hiperglucémico, la secreción de insulina, necesaria para la síntesis y posterior acción de somatomedinas (Argente et al, 2000a; Sperling, 2016).

1.10.7. Efectos sobre la insulina

El DGH se acompaña de cambios metabólicos, como la resistencia a la insulina y una mayor concentración en ayunas y tolerancia anormal a la glucosa (Beshyah et al, 1995).

La resistencia a la insulina se define como un trastorno en la homeostasis de la glucosa implicando una reducción de la sensibilidad de la acción de la insulina en músculos, tejido adiposo, hígado, entre otros tejidos, a pesar de encontrarse a una concentración normal o elevada en sangre (Rogowicz-Frontczak et al, 2017).

Se ha observado recientemente, tanto en animales como en humanos, que la GH puede estimular o reducir los niveles de insulina al actuar sobre las células- β pancreáticas (Rogowicz-Frontczak et al, 2017).

En un estudio realizado sobre niños con DGH en tratamiento con GH se vio que ésta no tiene efectos significativos sobre el aumento de la resistencia a la insulina y ningún efecto negativo en la homeostasis de la glucosa (Liang et al, 2018).

Baronio et al (2016) estudió la sensibilidad a la insulina (HOMA-S), la secreción de insulina [índice insulínico (IGI)] y la capacidad de las células- β para adaptarse a los cambios de sensibilidad a la insulina [índice de disposición oral (IDO)] en niños con DGH y en tratamiento. Aunque el HOMA-S no sufrió cambios, se observó un aumento en el IGI e IDO, llegando a ser significativo tras 6 años de tratamiento, sugiriendo que hay una influencia positiva del tratamiento con la GH en la capacidad secretora de las células- β en niños con DGH.

1.10.8. GH y metabolismo de los lípidos (lipólisis)

La GH produce movilización de los ácidos grasos desde sus lugares de almacenamiento, y aumenta los niveles circulantes de los mismos y su utilización (lipólisis) con el fin de obtener energía. La lipólisis consiste en la transformación de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol y se produce por estímulo de la lipasa en las células del tejido adiposo. Además, estimula la β -oxidación de los ácidos grasos (Bergan et al, 2015; Kubo et al, 2018).

Varios estudios mostraron que en niños prepuberales con DGH presentaban una alteración del perfil lipídico, con elevación de los triglicéridos, colesterol total y niveles de colesterol LDL, junto con niveles bajos de colesterol HDL comparado con controles sanos. El tratamiento de estos pacientes con GH ha demostrado que induce cambios favorables en el perfil lipídico, con una reducción de todos los valores (Metwalley et al, 2013; Capalbo et al, 2014; Rothermel y Reinehr, 2016; Cañete Estrada et al, 2017; Liang et al, 2018). Estos mismos resultados se han confirmado en adolescentes y adultos con DGH (Lanes et al, 2003).

Estas anormalidades presentes en la composición lipídica en pacientes con DGH pueden ser debidas a un aumento en la tasa de secreción y una reducción en la tasa de aclaramiento de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)(Kearney et al, 2001).

1.10.9. Efectos sobre la coagulación y fibrinólisis

La GH tiene efectos positivos sobre la coagulación y la fibrinólisis. El DGH favorece un estado protrombótico, con una reducción de la actividad fibrinolítica, pudiendo contribuir con un acrecentamiento del riesgo de eventos aterotrombóticos (Kyriakakis et al, 2016).

Las principales alteraciones observadas en pacientes con DGH son: aumento del fibrinógeno y del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y disminución de activador tisular del plasminógeno (t-PA). El PAI-1 es el principal inhibidor del t-PA, la uroquinasa y los activadores del plasminógeno y por tanto de la fibrinólisis o eliminación de los trombos en sangre (Kyriakakis et al, 2016).

El tratamiento con GH en niños con DGH mejora la hipercoagulabilidad, con una reducción del PAI-1, y un aumento de los niveles de insulina y del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR). Existe una correlación positiva entre la insulina/HOMA-IR y los parámetros de la coagulación, existiendo una relación entre el síndrome de resistencia a la insulina y el estado de hipercoagulabilidad (Cañete et al, 2012; Cañete et al, 2014b; Lanes, 2016).

1.10.10. GH y adipoquinas (leptina, adiponectina, etc.)

La terapia de reemplazo con GH afecta a algunas adipoquinas, tales como: adiponectina, leptina, osteoprotegerina, resistina, interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF- α), y la masa grasa, lo que sugiere que también en los niños, el tratamiento con GH tiene un papel en la regulación de los factores secretados por el tejido adiposo (López-Siguero, 2011; Capalbo et al, 2014; Meazza et al, 2014; Ciresi et al, 2016; He et al, 2016; Szalecki et al, 2018).

Hay una fuerte correlación entre leptina y liberación de GH. Se conoce que, en estados de obesidad, la secreción de GH está inhibida, sin embargo, en estados de desnutrición, tiende a aumentar. Esto hace suponer que el tejido adiposo tenga un papel en su secreción. La presencia de receptores de leptina en el hipotálamo, sugiere que la relación entre el tejido adiposo y la GH podría estar ejercida por la leptina (Ciresi et al, 2016; He et al, 2016; Cañete et al, 2017a).

1.10.11. Efectos cardiovasculares

Hoy se sabe que los principales efectos de la GH sobre el sistema cardiovascular son la estimulación del crecimiento de los cardiomiocitos con el consiguiente aumento de la masa muscular del corazón y la producción de óxido nítrico (NO), fundamental para mantener la homeostasis vascular inducida por IGF-1. En esta línea es capaz de revertir lesiones de la estructura vascular como el engrosamiento de la íntima media (Caicedo et al, 2018).

Niños prepúberes con DGH no tratados mostraron un aumento del grosor de la íntima media carotídea y un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV) a una edad temprana (Colao et al, 2001; Capalbo et al, 2013; Metwalley et al, 2013; Lanes, 2016).

El mayor factor de riesgo de la enfermedad cardiovascular, es la obesidad, principalmente la grasa localizada en la zona abdominal, debido a su asociación con la arterosclerosis y rigidez de la pared arterial. En numerosos estudios, se han encontrado que los pacientes con DGH presentan una composición corporal anormal, con reducción de la masa corporal magra y un crecimiento de la masa grasa, presentando principalmente obesidad visceral/abdominal (Salerno et al, 2004; Beauregard et al, 2008; Capalbo et al, 2012; Lanes, 2016).

En el estudio de Capaldo et al (2013), se detectaron niveles de homocisteína elevados en niños con DGH antes de iniciar el tratamiento con GH. Es sabido, que la homocisteína es un factor de riesgo independiente para los eventos cardiovasculares. Numerosos estudios han demostrado que es protrombótica, asociando elevadas concentraciones de esta con daño y disfunción del endotelio vascular (Abdu et al, 2001; Sesimalo et al, 2001; Esposito et al, 2004; Capalbo et al, 2013; Lanes, 2016).

La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un marcador de riesgo cardiovascular, siendo un inhibidor plasmático endógeno del óxido nítrico sintetasa endotelial (NOS endotelial). Niveles elevados de ADMA se asocian con una mayor inhibición de la NOS endotelial y con vasoconstricción, lo que representa el primer fenómeno que desencadena la disfunción endotelial y engrosamiento de la íntima media, son considerados como marcadores pronósticos de ECV y/o mortalidad. En algunos informes los niveles de ADMA aparecen elevados en pacientes prepúberes con DGH, aunque en otros trabajos no, lo que genera controversia (Thum et al, 2007; Gola y Giustina, 2012; De Marco et al, 2014; Onder et al, 2014; Langen et al, 2015).

En los pacientes con DGH existe una reducción de la masa ventricular izquierda, una inadecuada fracción de eyección y anomalías en el llenado ventricular izquierdo (Nygren et al, 2012, Gómez-Guzmán et al, 2015). Se ha comprobado que la GH aumenta la masa ventricular izquierda en niños tratados con GH y mejora la capacidad cardiopulmonar (Aurensanz et al, 2017; Capalbo et al, 2017)

El engrosamiento de la arteria carótida íntima media, representa uno de los primeros cambios morfológicos de la pared arterial en el proceso de aterogénesis. En un reciente estudio con una cohorte de 20 niños con DGH se detectó un aumento en el engrosamiento de la arteria carótida íntima media (Capalbo et al, 2009; Khadilkar et al, 2014).

Se ha visto que la GH junto con la melatonina son agentes potenciales para contrarrestar el estrés oxidativo, la apoptosis y los procesos inflamatorios en el corazón envejecido (Paredes et al, 2014). Además, la GH puede tener efectos beneficiosos sobre enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca (Caicedo et al, 2018; Marra et al, 2018)

Esto, señala la importancia de identificar marcadores de pronóstico para la arterosclerosis (ECV) y la prevención primaria de esta en niños con DGH (Cittadini et al, 2013; Isgaard et al, 2015).

1.10.11.1. Marcadores predictivos de enfermedad cardiovascular

Como se observa en la tabla 3, estudios recientes han identificado una lista de factores de riesgo de ECV en niños con DGH, alguno ya comentados previamente, que van desde: alteraciones en la composición corporal a anomalías en ultrasonidos. Recientemente, se han identificado nuevos marcadores, incluyendo la epigenética y metabólica capaces de detectar diferentes huellas digitales que podrían predecir un riesgo aumentado de ECV (De Leonibus et al, 2016).

La mayor parte de estas alteraciones son reversibles tras el tratamiento con GH, pudiendo reducir la carga del riesgo CV cuando se alcanza la edad adulta. Los nuevos marcadores epigenéticos y metabólicos podrían utilizarse como una herramienta clínica para la detección precoz en niños con DGH u otros trastornos del crecimiento con alto riesgo de ECV (De Leonibus et al, 2016; Marra et al, 2018).

Tabla 3. Marcadores de riesgo CV en niños con DGH (De Leonibus et al, 2016).

Alteraciones bioquímicas	
Perfil lipídico	↑ Colesterol LDL
	↑ Colesterol Total
	↓ Colesterol HDL
	↑ Índice aterogénico
	↑ PCR
Marcadores inflamatorios y fibrinolíticos	↑ Fibrinógeno
	↑ aPAI-1
	↑ Homocisteína
	↑ PAPP-A
	↑ ADMA
Estrés Oxidativo y función endotelial	↓ ON
	↓ Glutación
Composición corporal	
Anormalidades en la composición corporal	↑ Razón cintura/ talla.
	↑ Perímetro abdominal
	↑ Relación cintura/ cadera
Anomalías ecográficas	
Anomalías en ultrasonido	↓ Ultrasonido del corazón- MVI e IMVI; HVI y DDVI.
	↑ Ecografía de la carótida- c IMT
Perspectivas de futuro	
Marcadores epigenéticos	Metilación del ADN y modificación de histonas afectando a la expresión de genes
Marcadores metabolómicos	Metabolitos implicados en el recambio/función y metabolismo lipídico

LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; PCR: proteína C reactiva; aPAI-1: inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno; PAPP-A: proteína plasmática-A asociada al embarazo; ADMA: dimetilarginina asimétrica; ON: óxido nítrico; MVI: masa ventricular izquierda; IMVI: índice de masa del ventrículo izquierdo; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; DDVI: disfunción diastólica del ventrículo izquierdo; cIMT: grosor íntima-media carotideo.

1.10.12. Efectos sobre la retina

Modelos experimentales muestran un papel importante de la GH en el desarrollo de la retina. Se realizó un estudio para evaluar la neurovascularización de ésta en el DGH aislado congénito y sin tratar, donde se observó en éstos, una reducción significativa en el desarrollo vascular retiniano versus controles sanos. Lo mismo se observó con el disco óptico inflamado y el tamaño de la copa. Sin embargo, no encontraron diferencias entre ambos grupos, relacionados con el grosor macular (Pereira et al, 2016).

Se ha encontrado GH en el fluido vítreo del ojo humano, responsable de la regulación de la función retiniana, así como de proporcionar marcadores de disfunción ocular. En un estudio se mostró que la GH es detectable en el cristalino de pacientes con retinopatía diabética proliferativa, hemorragia vítrea, desprendimiento de retina, hemorragia subretiniana, agujero macular, oclusión de la vena central de la retina, luxación del cristalino o membrana epirretinales, aunque los resultados no implican la presencia de GH vítrea en cualquiera de estas condiciones, comparada con controles (cadáveres) sin historia de enfermedad ocular (Harvey et al, 2009; Ziaei et al, 2009).

Se ha visto que la inmunoneutralización de GH endógena en los ojos de embriones de pollo produce la muerte de las células ganglionares de la retina *in vitro* e *in vivo* (Sanders et al, 2005; Sanders et al, 2006). Nuestro grupo ha encontrado aumento del grosor de las células ganglionares de la retina tras tratamiento con GH en niños con DGH (Giménez Gómez et al, 2016). El papel de la GH en el ojo humano es aún desconocido, aunque podría estar involucrada en la visión normal, al estar la GH hipofisaria implicada en la vascularización retiniana y de la etiología de la retinopatía (Yukizane et al, 1990; Frystyk, 2005).

Por tanto, la producción local de esta en el ojo debe tener un papel en la progresión, diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades oculares (Ziaei et al, 2009; Fleming et al, 2016).

1.10.13. Efectos en pacientes con enfermedad renal crónica (IRC)

El eje GH/IGF-1 interviene en el desarrollo y la función normal de los riñones. La alteración en la regulación de éste conlleva el desarrollo de enfermedades renales (Mahesh y Kaskel, 2008). En unas ocasiones, potenciando la actividad IGF-1 (ej. nefropatía diabética aguda y riñones poliquísticos), en otros casos, se produce una resistencia a la IGF-1 (ej. enfermedad renal crónica) (Kumar et al, 2011; Bach y Hale, 2015).

La enfermedad renal crónica (ERC) se asocia con una alta morbimortalidad, debido a la ECV, especialmente en pacientes sometidos a diálisis. En este sentido, la uremia contribuye con un ambiente que lleva a la malnutrición a través de múltiples mecanismos, produciendo una alteración en el eje GH/IGF-1 que produce talla baja.

La reducción del aclaramiento de citoquinas, endotoxinas y la formación de productos de glicación avanzada contribuyen a una activación inapropiada del SNC, el sistema renina-angiotensina (RAS) y alteración del eje GH/IGF-1 (Gola et al, 2005).

Varios estudios señalan que el tratamiento con GH en este tipo de pacientes, mejoraría el estado nutricional e inflamatorio, reduciendo el riesgo de mortalidad asociada a la enfermedad renal y un efecto muy positivo sobre el crecimiento. Los efectos adversos son muy poco frecuentes (Gupta et al, 2011; Bach y Hale, 2015; Bizzarri et al, 2018).

1.10.14. Funciones sobre el intestino

El síndrome de intestino corto (SIC) se caracteriza por la imposibilidad de mantener el equilibrio energético de proteínas, líquidos, electrolitos o micronutrientes, por la malabsorción y diarrea crónica, deshidratación, desequilibrio hidroelectrolítico y desnutrición. Frecuentemente, requieren nutrición parenteral a largo plazo para mantener los requerimientos nutricionales diarios hasta que el intestino residual se adapte y pueda lograrse la autonomía nutricional (Wales et al, 2010).

La opción ideal es el trasplante de intestino; pero la tasa de supervivencia a largo plazo no es alta.

Byrne et al (1995a, b), propusieron un programa a través de ensayos no controlados, que incluyó GH, glutamina oral y dieta modificada para aumentarla compensación intestinal y disminuir la insuficiencia del órgano, sugiriendo un efecto positivo de la GH.

Desde entonces, se han realizado ensayos clínicos controlados vs placebo, para evaluar el efecto de la GH aislada o en combinación con glutamina en pacientes con SIC con fallo intestinal con mejora en el peso corporal e IMC (Seguy et al, 2014).

Se ha encontrado en pacientes con DGH, la coexistencia de enfermedades inflamatorias crónicas del tracto intestinal, principalmente celiacía. En estos pacientes el tratamiento con GH podría resultar beneficioso (Witkowska-Sędek et al, 2018).

Con independencia de los beneficios que parecen ser transitorios y desaparecen a las pocas semanas tras la última administración, probablemente, por la vida media corta de la rhGH y el rápido recambio de los enterocitos. No se utiliza de forma rutinaria en Europa, aunque está autorizada por FDA desde 2004 (Williamson, 1978; Seguy et al, 2014; Castro-Feijóo et al, 2015; Witkowska-Sędek et al, 2018).

1.11. Mal uso y abuso de la GH en el deporte

Además de las indicaciones aprobadas, actualmente se hace un mal uso como agente de dopaje en el mundo del deporte. Principalmente por sus acciones anabólicas, creación de masa muscular, efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos y grasas y su capacidad para acelerar la recuperación tras una lesión (Nicholls y Holt, 2016).

Uno de los principales inconvenientes es la dificultad en su detección, debido a su vida media corta y sólo es posible durante un período de tiempo reducido, apareciendo en baja concentración en la orina. La secuencia de aminoácidos de la molécula recombinante es idéntica a la hormona natural, dificultando también su detección (Healy y Russell-Jones, 1997; Birzniece et al, 2011; Holt, 2011; Baumann, 2012). La monitorización de esta tiene dos aproximaciones. La primera basada en la Agencia Mundial Antidoping (AMA o sus siglas en inglés WADA), donde la detección se realiza mediante la utilización del inmunoensayo diferencial de isoformas en suero (test de isoformas) (Wada guidelines, 2014). Esta técnica se basa en que la GH sólo se en-

cuentra en una sola isoforma nativa, mientras que la GH en circulación se encuentra en varias formas. Por lo tanto, cuando se inyecta GH en el cuerpo, aumenta la proporción de esta isoforma respecto de todas las otras formas en circulación (Such-Sanmartín et al, 2015). La muestra se considera alterada si la proporción excede de los límites de decisión (LD) específicos para el género y ensayo dependiente del kit (Sonksen, 2001; Holt, 2011; Baumann, 2012).

La segunda, consiste en la medición de 2 biomarcadores, la IGF-1 y niveles de péptido pro-colágeno amino-terminal tipo III (P-III-NP), propuesto y validado por el consorcio GH-2000/4, (Wada, 2016; Holt et al, 2015) mediante la utilización de inmunoensayos o cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) (Ferro et al, 2015). La utilización de LC/MS representa un futuro prometedor en la detección de la GH con una gran sensibilidad (<10 ng/mL) (Thevis et al, 2010; Arsene et al, 2014).

La Lista de Prohibiciones fue publicada inicialmente en 1963 bajo el liderazgo del Comité Olímpico Internacional (IOC, *International Olympic Committee*). Desde el 2004 y según el Código Mundial Antidopaje, la AMA es responsable de la preparación y su publicación (Disponible en: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-prohibited-list-en.pdf>). Además, aparece en la lista de sustancias prohibidas de 2006 de la FIFA, con la categoría S2 “hormonas y sustancias relacionadas” (Wong et al, 2016).

Hay que conocer que, estas sustancias también pueden ser producidas “in vivo” mediante la inserción de genes apropiados. Según los datos publicados, el dopaje genético se asocia a la introducción en el organismo del transgén y/o proteína recombinante para provocar su expresión o para modular la de un gen existente, con el objetivo de lograr una ventaja mayor en el rendimiento psicológico de un atleta (Pokrywka et al, 2013).

Según la lista de sustancias prohibidas por la AMA en 2009, el dopaje genético se ha definido como: “el uso no terapéutico de células, genes, o elementos genéticos o modulación de la expresión genética, con capacidad para aumentar el rendimiento atlético.” (Wada, 2009). En 2013, AMA clarificó el tipo de manipulación de material genético prohibido en el deporte al definirlo como la transferencia de ácidos nucleicos o de sus análogos a las células o el uso de células modificadas genéticamente.

Entre los principales candidatos para el dopaje genético se encuentra entre otros la GH. Los datos sugieren que IGF-1, GH y rhGH podrían desempeñar un papel importante en deportes de fuerza. Los productos proteicos de dichos genes se relacionan con un aumento específico de la resistencia, fuerza física, redistribución de la grasa o con el aumento de la masa muscular. El dopaje genético que usa la transferencia genética IGF-1 podría proporcionar niveles altos y estables de la proteína IGF-1. Este método sería relativamente seguro porque el efecto de sus acciones se limitaría a los músculos diana. Se ha demostrado que la sobreexpresión de IGF-1 y su producto proteico, junto con un aumento del entrenamiento de resistencia induce una mayor hipertrofia muscular. Asimismo, permitió la regeneración de músculo esquelético después de una lesión (Schertzer y Lynch, 2006).

Se realizaron enfoques genéticos y proteómicos en catorce individuos sanos de sexo masculino tratados con GH para estudiar el gen FN1, la proteína FN1, el gen RAB31 y la proteína RAB31 como biomarcadores potenciales para el abuso de GH. Los resultados mostraron que tanto los genes RAB31 y FN1 y la proteína FN1 podrían ser biomarcadores potenciales para la administración de GH. Evaluaciones preliminares de la influencia del sexo, edad, actividades deportivas de gran intensidad y GHRP-2 (pralmorelina, un péptido liberador de GH) sugieren que estos no son factores de confusión relevantes. Por tanto, los marcadores seleccionados presentan sensibilidad alta y una ventana de detección más amplia para la detección de GH que para el propio IGF-1 (Ferro et al, 2016).

1.12. Marco conceptual

Estudios recientes destacan la importancia de la proteómica para identificar marcadores séricos relacionados con la respuesta antiinflamatoria de la GH y la reducción de los marcadores de riesgo cardiovascular (De Leonibus et al, 2016).

Anderson et al (2009), emplearon una aproximación farmacoproteómica para identificar marcadores novedosos que correlacionan el crecimiento con la respuesta al tratamiento con GH en niños prepuberales con DGH o talla baja idiopática. Se incluyeron 128 niños (39 con DGH y 89 talla baja idiopática) y se analizaron los perfiles de expresión de proteína sérica al comienzo del estudio y tras 1 año de tratamiento empleando la Espectrometría de Masas en "Tiempo de Vuelo" mediante Desabsorción-Ionización por Láser de Superficie (SELDI-TOF) y la SDS-PAGE (acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)) para la identificación de las proteínas. La combinación de picos proteicos que se correlacionaban con la respuesta de crecimiento tras tratamiento con GH correspondían a las apolipoproteínas A-I, A-II, C-I, C-III, la transtiretina y la proteína amiloide A4 sérica, las cuales forman parte de la lipoproteína de alta densidad. De esta forma, las apolipoproteínas y la transtiretina podrían desempeñar un papel en la sensibilidad de la GH y predecir el crecimiento en respuesta al tratamiento con GH en niños prepuberales con DGH o talla baja idiopática.

En otro análisis de proteómica, se identificaron patrones de expresión específicos de proteínas asociados con la mineralización ósea y la altura variable en respuesta al tratamiento con GH. Los picos encontrados corresponden principalmente a apolipoproteínas, transtiretina, proteína amiloide sérica A4 y hemoglobina beta (Andersson et al, 2011).

Decker et al (2013), emplearon una aproximación proteómica para mostrar que las diversas apolipoproteínas y la subunidad de hemoglobina A se asocian a una remodelación de la composición corporal (masa grasa, masa muscular y masa ósea) en respuesta al tratamiento con GH en niños prepuberales con talla baja tras 1 año de tratamiento. Para el análisis de los perfiles proteicos se empleó la Espectrometría de Masas en "Tiempo de Vuelo" mediante Desabsorción-Ionización por Láser de Superficie. La composición corporal se analizó mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DXA), estimando la masa libre de grasa (MLG). Dicho conocimiento podría emplearse en el futuro para crear herramientas que mejoren el tratamiento

individualizado con GH en lo concerniente a la respuesta metabólica además del crecimiento longitudinal de los huesos.

También se han realizado estudios proteómicos para identificar biomarcadores séricos en adultos diagnosticados de DGH y tratado con GH (Cruz-Topete et al, 2011). Se recogieron muestras de sangre (n = 8, 3 mujeres y 5 hombres) en el periodo basal y tras 3 meses de tratamiento y se evaluaron empleando electroforesis en gel bidimensional seguido de identificación proteica por espectrometría de masas. En términos del proteoma sérico, se identificaron 111 proteínas. La intensidad de seis se alteró significativamente. De estas, cinco fueron identificadas como isoformas de la haptoglobina, apareciendo disminuidas tras el tratamiento con GH. Por otro lado, la APOA1 aumentó tras el tratamiento con GH (Durán-Ortiz et al, 2017).

Se investigó sobre la posible presencia y acción de la GH en la retina neural en ratones recién nacidos. En ausencia de señalización de la GH, cuatro proteínas en el proteoma retinal de los ratones GHR^{-/-} (identificados con electroforesis bidimensional y espectrometría de masas) difirieron en abundancia con respecto a aquéllos de los ratones silvestres. Dichas proteínas están implicadas en la vascularización de la retina, la proliferación neural y el crecimiento neurítico. Por tanto, la GH podría desempeñar funciones insospechadas en dichos procesos durante el desarrollo de la retina (Baudet et al, 2008).

1.13. ÓMICAS

1.13.1. Introducción

El sufijo «-oma» tiene un origen latino y significa «conjunto de» (Curtis y Schnek, 2008). En biomedicina, las ómicas engloban a todas aquellas disciplinas, tecnologías y áreas de investigación que estudian el conjunto o totalidad de un sistema biológico. Estos incluyen: Genómica, Proteómica, Transcriptómica, Metabolómica, Epigenómica, Interactómica, Metagenómica, Lipidómica, Alimentómica o Foodómica, Secretómica, Glicómica entre otras.

En la tabla 4 se describen los principales tipos de «ómicas» (Suravajhala et al, 2016).

Tabla 4. Principales tipos de «ómicas» (Suravajhala et al, 2016).

Ómica	Descripción
Genómica	Estudia el contenido, organización, función y evolución de la información molecular del ADN contenida en el genoma completo.
Proteómica	Es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función.
Trascriptómica	Es el estudio del conjunto de ARN (ARNr, ARNt, ARNm, ARNi, miARN) que existe en una célula, tejido u órgano.
Metabolómica	Es el estudio de perfiles metabólicos (moléculas pequeñas) como producto de muestras biológicas.
Epigenómica	Estudio de los cambios epigenéticos en una célula. Los cambios epigenéticos son los cambios que se producen en el modo en que los genes se activan o desactivan sin cambiar la secuencia misma del ADN. Estos cambios dependerían de la edad y la exposición a factores ambientales como el régimen de alimentación, el ejercicio, los medicamentos y las sustancias químicas.

ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; ARNr: ácido ribonucleico ribosómico; ARNt: ARN de transferencia; ARNm: ARN mensajero; ARNi: ARN de interferencia; miARN: micro ARN.

A su vez, cada una de ellas ha ido ramificándose a medida que se van obteniendo un mayor número de datos (Suravajhala et al, 2016). La investigación ómica representa un enfoque científico que difiere del histórico por el cual un producto genético simple, proteína o ruta metabólica se utiliza como modelo para ver cómo funciona en respuesta a un estímulo o estímulos (Bradburne et al, 2015). Los perfiles moleculares pueden variar en células o tejidos, mediante la exposición de fármacos, agentes químicos o patológicos, pudiendo tener aplicación tanto para dilucidar la etiología de la enfermedad, como en su detección y enfoques de carácter preventivo.

Todas las “ómicas” se basan en el análisis de un gran volumen de datos, y por lo tanto se valen de la bioinformática y de técnicas rápidas y automatizadas de alto rendimiento (del inglés high-throughput). Estas técnicas han facilitado el entendimiento de la respuesta molecular al daño celular o tisular, así como la alteración en el nivel del sistema funcional celular (Aardema y MacGregor, 2002; Dulin et al, 2012; Wheelock et al, 2013; Badawi, 2017).

1.13.2. Genómica

Es la ciencia que estudia el genoma de un organismo. Éste consiste en el ADN de una célula, incluyendo su contenido, organización y función. Todas las células, excepto el huevo y el espermatozoides transportan un genoma idéntico (Watson y Crick, 1953). Los avances en este campo han permitido a los clínicos determinar qué pacientes tienen más probabilidad de responder favorablemente a una determinada medicación.

La genómica también ofrece oportunidades a los individuos para someterse a una evaluación genética para determinar si porta genes que causen enfermedad o incrementen el riesgo de ésta. Por ejemplo, mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario pueden ser evaluadas para determinar si son portadoras de mutaciones o no en los genes BRCA1 o BRCA2 antes de que se desarrolle cualquiera de estas enfermedades (Bradburne et al, 2015; Dorman et al, 2016).

1.13.3. Transcriptómica

La transcriptómica es la ómica de la expresión de ARN la cual describe cómo se expresan los genes y puede ser un indicador de respuestas a los estímulos ambientales o locales.

El ARN mensajero (ARNm) es muy inestable con una semivida corta que no suele superar 7-10 minutos fuera del organismo, y puede facilitar un nivel de señal temporal para seguir los cambios en la expresión genética. No obstante, el transcriptoma puede facilitar biomarcadores de interacción potenciales con el exposoma externo e interno. Los biomarcadores de transcriptoma se han definido o sugerido como marcadores de salud metabólica (Heidecker et al, 2011; Zhang et al, 2012; Brothers et al, 2013).

En este campo, el contenido de ARN se mide experimentalmente mediante la obtención de ARN, convirtiéndolo en ADN complementario (ADNc) y luego analizándolo en varias plataformas genómicas (ej. chips de ADN, secuenciación de nueva generación (NGS), o secuenciadores de tercera generación) (Bradburne et al, 2015).

1.13.4. Epigenómica

Es el estudio de los cambios epigenéticos en una célula. Los cambios epigenéticos son los cambios que se producen en el modo en que los genes se activan o desactivan sin cambiar la secuencia del ADN. Estos cambios dependerían de la edad y la exposición a factores ambientales como el régimen de alimentación, el ejercicio, los medicamentos y las sustancias químicas (Berger et al, 2009; Bradburne et al, 2015).

Las modificaciones más comunes incluyen: modificación del ADN a través de la metilación y modificación de histonas, las cuales pueden activar o reprimir la expresión de los genes o los cambios en la estructura de la cromatina y en el posicionamiento del nucleosoma.

Estas modificaciones provocan, principalmente, tres consecuencias funcionales: activación o represión transcripcional, o recombinación aumentada e inestabilidad genómica.

Además, estas se han asociado con enfermedades en humanos. Incluyen una variedad de tipos de cáncer (mama, estómago, endometrio, ovario, páncreas, melanoma y colon), trastornos neurológicos (enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, alfa talasemia, retraso mental, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y distrofia miotónica congénita), y en-

fermedades con componentes autoinmunes incluyendo la artritis reumatoide y la diabetes tipo 1 (Portela y Esteller, 2010; Bonder et al, 2017).

La tercera generación de secuenciadores facilita una plataforma para el estudio de marcadores epigenéticos, no sólo facilita información de la secuencia primaria, sino que también provee información sobre modificaciones epigenéticas (Bradburne et al, 2015).

1.13.5. Metabolómica

La metabolómica, es la medida global de todos los perfiles metabólicos: sustratos, productos intermedios y del metabolismo, incluyendo pequeñas moléculas, orgánicas e inorgánicas, ácidos grasos, péptidos, lípidos, carbohidratos, entre otras incluyendo una gran variedad de xenobióticos.

El instrumental en este campo ha progresado lentamente en relación a la sensibilidad que alcanza la técnica y el número de metabolitos detectables. Profundizando en el instrumental utilizado, el de medición de masas de alta precisión es fundamental para la metabolómica, donde el número de moléculas isobáricas es muy elevado y los métodos para reducir la coelución de especies isobáricas se deben tener en cuenta a la hora de desarrollar plataformas (Awad y El-Aneed, 2013).

Otro aspecto a tener en cuenta es la alta proporción de compuestos emparejados que sean difíciles de discriminar. La espectrometría de masas de alta resolución y las bibliotecas de espectros de masa pueden ayudar a reducir el número de posibles compuestos emparejados (Bradburne et al, 2015).

1.13.6. Proteómica

Se define como el análisis a gran escala de las proteínas de un sistema biológico determinado y en un momento concreto. El proteoma, el contenido de todas las proteínas de un sistema biológico concreto, es muy dinámico y está en constante cambio de acuerdo a diferentes estímulos. La proteómica abarca el conocimiento estructural y funcional de las proteínas, así como la cuantificación de su abundancia, el estudio de sus modificaciones, sus interacciones, y el estudio de su ubicación (Pandey y Mann, 2000).

1.13.6.1. Áreas generales de la proteómica

Dependiendo del objetivo general, se pueden dividir la mayoría de los estudios en tres áreas diferentes:

1.13.6.1.1. Proteómica cualitativa

La meta de la proteómica cualitativa es identificar y caracterizar un grupo completo de proteínas presentes en una muestra, lo cual puede abarcar también la caracterización de las modificaciones postraduccionales (post-translational modifications, PTMs).

Estos estudios se pueden enfocar en un proteoma completo (por ejemplo, el proteoma del plasma) o en un subgrupo específico de proteínas (por ejemplo, las proteínas glicosiladas). En la actualidad, la espectrometría de masas es el método preferido para la caracterización e identificación de proteínas. En general, se comparan los datos obtenidos experimentalmente en espectrometría de masas con las masas teóricas obtenidas a partir de entradas en bases de datos de proteínas o de genes, utilizando motores de búsqueda como Sequest (Eng et al, 1994) o Mascot (Perkins et al, 1999).

Las aproximaciones más comunes para la identificación de proteínas son la huella peptídica (peptide mass fingerprinting, PMF) y la huella de fragmentación de péptidos (peptide fragmentation fingerprinting, PFF). En la técnica de huella peptídica (Pappin et al, 1993), las masas de los péptidos obtenidos de la digestión enzimática de la proteína que se quiere identificar o caracterizar se obtienen mediante espectrometría de masas. Normalmente se utiliza tripsina como proteasa para digerir la proteína de interés, y la electroforesis bidimensional (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) como método de separación de proteínas para aislar dicha proteína. En el PFF (Eng et al, 1994), en cambio, los péptidos procedentes de la digestión enzimática son fragmentados en el interior del espectrómetro de masas, obteniéndose las masas de los fragmentos de los péptidos en vez de las masas de los péptidos de la proteína. Este procedimiento de fragmentación peptídica, conocido como espectrometría de masas en tándem o MS/MS, permite identificar una proteína sin ambigüedad, ya que las masas de los fragmentos proporcionan información sobre la secuencia del péptido.

Para ambas aproximaciones, es necesario que las secuencias de las correspondientes proteínas estén disponibles en las bases de datos en las que se va a hacer la búsqueda. Si la proteína que se intenta identificar no está en la base de datos, se podría identificar igualmente si hay alguna otra proteína con alta homología, pero de no ser el caso, los péptidos tendrán que ser secuenciados de *novo*, esto es, el espectro de fragmentación (MS/MS) debe interpretarse manualmente, o con ayuda de un software específico, para así obtener la secuencia del péptido (Shevchenko et al, 1997).

Por otra parte, la caracterización proteica incluye la detección y localización de modificaciones postraduccionales. Estas desempeñan un papel crucial en los sistemas biológicos, ya que afectan a la actividad, localización y estabilidad de las proteínas. Se conocen más de 300 tipos diferentes, aunque sólo unas pocas se están investigando en profundidad, como es el caso de la fosforilación, acetilación, glicosilación, o la oxidación (Zhao y Jensen, 2009).

1.13.6.1.2. Proteómica diferencial/cuantitativa. Técnica SWATH

La información cuantitativa a nivel proteico, como la abundancia relativa entre diferentes muestras de una proteína específica, o la cantidad absoluta de la proteína, puede ser de gran utilidad para buscar diferencias entre diversas condiciones, por ejemplo, para establecer biomarcadores de enfermedad.

La cuantificación relativa se puede realizar a través de diferentes metodologías, las cuales se pueden clasificar como aproximaciones basadas en gel, aproximaciones con marcaje, y aproximaciones sin marcaje o label-free (Panchaud et al, 2008).

Los métodos basados en gel consisten en la separación de proteínas a través de electroforesis, normalmente electroforesis bidimensional, y la comparación de la abundancia proteica determinada por el volumen de la banda, mancha o spot entre las diferentes muestras. Cada muestra que se está comparándose puede correr en un gel diferente o, por otro lado, se pueden marcar diferencialmente hasta tres muestras y correrse en un mismo gel utilizando la tecnología DIGE (difference gel electrophoresis) (Minden et al, 2009), lo cual aumenta el grado de confianza en la detección y cuantificación de diferencias de abundancia proteica y reduce el número de geles requeridos para realizar el experimento. En los métodos basados en marcaje, se marcan las proteínas o péptidos previamente usando moléculas que añaden un extra de masa a los péptidos, y la cuantificación relativa se obtiene a partir de los datos de espectrometría de masas o de espectrometría de masas en tándem. De acuerdo al método de marcaje de que se trate, las proteínas o los péptidos son previamente: (i) marcados metabólicamente (se provee a las células en cultivo o al modelo animal con nutrientes marcados isotópicamente); (ii) marcados químicamente con diversas etiquetas isotópicas; o (iii) marcados con ^{18}O vía digestión enzimática en agua marcada con H_2^{18}O . Cada muestra se marca con un isótopo diferenciador, de modo que la cuantificación de un péptido determinado se basa en la relación entre las intensidades de las distintas formas isotópicas de dicho péptido.

En las aproximaciones *label-free* sin marcaje, la cantidad de proteína se calcula sin necesidad de utilizar marcajes o isótopos estables. La cuantificación se realiza comparando las áreas de los cromatogramas del mismo péptido encontrado en diferentes muestras (cada muestra se analiza en una carrera de cromatografía líquida-espectrometría de masas, LC-MS, diferente) (Chelius y Bondarenko, 2002), o bien se obtiene relacionando el número de espectros MS/MS identificados como pertenecientes a una misma proteína con la abundancia de dicha proteína, metodología conocida como conteo de espectros (*spectral count*) (Asara et al, 2008).

Para la cuantificación absoluta de proteínas, se requieren péptidos sintéticos marcados con isótopos como estándares internos para cada proteína de interés; requiriendo, que la(s) proteína(s) a cuantificar sea conocida(s) a priori (Gerber et al, 2003).

En la tabla 5 se muestra un resumen de las aproximaciones tradicionales que se han utilizado con mayor frecuencia en la proteómica cuantitativa.

Tabla 5. Principales aproximaciones tradicionales en proteómica cuantitativa (disponible en Gallardo et al, 2013).

Cuantificación	Aproximación	Método	Ejemplos	Referencias
Relativa	Basada en gel	Comparación abundancia de la señal	DIGE	Unlu et al., 1997
		Basada en marcaje	Marcaje metabólico con isótopos	SILAC
	Marcaje químico con isótopos		ICAT	Gygi et al., 1999
	Etiquetado enzimático con isótopos		ICPL	Schmidt et al., 2005
			TMT	Trompson et al., 2003
			iTRAQ	Ross et al., 2004
	Sin marcaje	Intensidad de señal del MS	SELDI-TOF MS	Vorderwulbecke et al., 2005
LC-MS/MS			Extracción de cromatograma	Chelius y Bondarenko, 2002
Contaje de espectros		Contaje de espectros	Aasara et al., 2008	
Uso de péptidos sintéticos marcados isotópicamente		AQUA	Gerber et al., 2003	
Absoluta				

DIGE, electroforesis diferencias en gel; SILAC, etiquetado de isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular; ICAT, marcaje de afinidad codificada por isótopos; ICPL, marcaje proteico codificado por isótopos; TMT, etiquetados de masas tandem; iTRAQ, marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta; SELDI-TOF, desorción/ionización por láser aumentada por superficie-tiempo de vuelo; XIC, cromatograma extraído de iones; AQUA, cuantificación absoluta.

En los últimos años, las metodologías proteómicas cuantitativas se han ampliado con la introducción de la técnica *selected reaction monitoring* (SRM), un modo de adquisición por LC-MS/MS muy sensible que se utiliza frecuentemente en la investigación biomédica para verificar y validar proteínas candidatas a biomarcadores (Gallien et al, 2011).

Técnica SWATH

La técnica SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) se engloba dentro de los métodos de espectrometría de masas (mass spectrometry, MS) con adquisición independiente de datos (*data-independent acquisition*, DIA), que han mostrado ser una alternativa para superar las limitaciones de los métodos MS de adquisición dependiente de datos (*data-dependent acquisition*, DDA).

En DIA, se adquieren los espectros de masas en tándem (MS/MS) resultantes de la fragmentación simultánea de todos los péptidos dentro de un rango de masas, sin una pre-selección de los iones precursores que se van a fragmentar (Gillet et al, 2012).

Se han desarrollado varios métodos DIA, empleando, normalmente, un analizador de masas de alta resolución. Se dividen en dos grupos diferentes: (i) aquéllos que adquieren simultáneamente los espectros fragmentados de todo el rango de masas (o más correctamente, el rango de masa/carga, m/z , como el método MS^e (Geromanos et al, 2009); y (ii) aquéllos que escanean el rango m/z en ventanas secuenciales, cuyo resultado es la reducción de la complejidad de los espectros fragmentados (Gillet et al, 2012; Chapman et al, 2014), como es el caso de SWATH.

Para la identificación de los péptidos y proteínas presentes en la muestra, se utiliza o bien una librería de espectros de péptidos generadas con herramientas comunes a las utilizadas en DDA (es decir, péptidos identificados con motores de búsqueda a partir de carreras de LC-MS DDA); o bien a través de la búsqueda directa en las carreras DIA de pseudoespectros MS/MS reconstituidos basándose en perfiles de co-elución de los péptidos precursores y sus fragmentos potenciales (Chapman et al, 2014; Anjo et al, 2017).

Comparando la técnica SWATH con los métodos de proteómica cuantitativa tradicionales basados en DDA, SWATH proporciona, una mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, permitiendo la detección y cuantificación de virtualmente todos los compuestos detectables en una muestra (Shi et al, 2016; Gillet et al, 2012). Esto hace que sea una estrategia de proteómica cuantitativa muy potente y muy prometedora para el descubrimiento de biomarcadores, donde ya está proporcionando resultados (Craft et al, 2013; Liu et al, 2013; Holewinski et al, 2016; Anjo et al, 2017).

1.13.6.1.3. Proteómica funcional

Esta estudia la interacción entre proteínas o entre proteína y otras moléculas, y las consecuencias de dichas interacciones (Kiemer y Cesareni, 2007). La proteómica basada en la actividad es otra área relacionada con la proteómica funcional y estudia las actividades específicas de las proteínas en una muestra, tales como la función y la inhibición (Serim et al, 2012).

El *MS imaging*, un nuevo modo de *imaging*, permite el mapeo de proteínas sobre un tejido o una sección de muestra, y está demostrando ser una herramienta relevante para la proteómica funcional, ya que la localización de diferentes isoformas permite conocer información adicional sobre sus funciones (Angel y Caprioli, 2013).

1.13.6.2. **Flujos de trabajo en proteómica: proteómica bottom-up y proteómica top-down**

El análisis de un proteoma consiste normalmente, tras la preparación de la muestra, en una o más etapas de separación a nivel de proteínas o péptidos, seguido de análisis por espectrome-

tría de masas. La gran diversidad y enorme rango dinámico de las proteínas en las muestras biológicas, supone un gran desafío para el análisis por espectrometría de masas. Por ejemplo, se estima un rango dinámico de 10^{12} para las proteínas del proteoma de plasma humano (Jacobs et al, 2005).

Por esta razón, la preparación de las muestras incluye frecuentemente etapas de enriquecimiento en las proteínas de interés.

Cuando se trabaja con muestras complejas existen protocolos de actuación que incluyen la depleción de las proteínas mayoritarias, enriquecimiento de las minoritarias y/o de interés e incluso la purificación parcial de la proteína (s) diana (s) (Martinez-Maqueda et al, 2012).

Dependiendo de si el análisis se lleva a cabo sobre las proteínas intactas o digeridas en péptidos, existen dos tipos de flujo de trabajo, la proteómica *top-down* y *bottom-up*, respectivamente.

En la aproximación *bottom-up*, las proteínas son digeridas enzimáticamente, normalmente utilizando la proteasa tripsina, y los péptidos resultantes se analizan por espectrometría de masas (Pandey y Mann, 2000). Por tanto, esta aproximación es conocida, en ocasiones, como proteómica basada en péptidos. Las aproximaciones *bottom-up* se pueden dividir en dos grupos dependiendo de si el paso de fraccionamiento, en el que se reduce la complejidad de la muestra, se lleva a cabo a nivel proteico o a nivel peptídico; es decir, antes o después de la digestión enzimática de las proteínas. Un ejemplo de la primera estrategia es la aproximación basada en electroforesis en gel bidimensional (2-DE), donde las proteínas se separan de acuerdo a punto isoeléctrico y peso molecular de modo que se puedan recuperar individualmente a partir del gel y digerir con una proteasa como la tripsina para convertirlas en péptidos. La mezcla peptídica resultante se analiza por espectrometría de masas para la identificación de las proteínas. En la segunda estrategia, conocida como proteómica “*shotgun*”, una mezcla más o menos compleja de proteínas se digiere enzimáticamente sin que haya fraccionamiento previo, y la mezcla resultante de péptidos se separa por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC), en ambos casos cromatografía de fase reversa. La cromatografía está conectada en línea al espectrómetro de masas, de modo que los péptidos que van eluyendo de la cromatografía van siendo analizados por espectrometría de masas. Sin embargo, en función de la complejidad de la mezcla de péptidos, en ocasiones se hace necesario algún paso adicional de fraccionamiento a nivel peptídico, por ejemplo, mediante cromatografía multidimensional, siendo la combinación de cromatografía de intercambio catiónico con cromatografía de fase reversa la más utilizada.

Como alternativa a la proteómica *bottom-up*, la aproximación *top-down* caracteriza los fragmentos producidos por la disociación de las proteínas intactas (sin digerir) directamente dentro del espectrómetro de masas, evitando la variabilidad introducida por el proceso de digestión proteica. Aunque esta clase de análisis de las proteínas intactas está actualmente disponible gracias a los nuevos mecanismos de disociación y a la alta exactitud de masas que proporcionan los nuevos equipos de espectrometría de masas de alta resolución, su uso aún es limitado (MacLafferty et al, 2007).

1.13.6.3. Preparación de la muestra

La forma en que se preparan las muestras es clave dentro de un análisis proteómico. La preparación de muestras incluye una primera etapa de extracción de las proteínas, y suele incluir también una o varias etapas de purificación. Es importante considerar que no existe un protocolo de extracción ni un tampón de extracción universal, y por tanto ambos deben optimizarse para cada tipo de muestra que se vaya a analizar, con el fin de maximizar la recuperación de proteínas y minimizar las proteólisis y la generación de modificaciones en las mismas. Entre los compuestos que componen los tampones de extracción, destacan: reactivos para estabilizar y solubilizar las proteínas, tales como los reguladores de pH (P.ej., Tris, Hepes, MOPS), los agentes reductores (P.ej., ditioneitol, 2-mercaptoetanol) y desnaturizantes (P.ej., 8 M urea, SDS, CHAPS); compuestos para la eliminación de contaminantes como los ácidos nucleicos (P.ej., DNasas); y los inhibidores de proteasas (P.ej. PMSF o EDTA). La mayoría de los tampones utilizados contienen compuestos que no son totalmente compatibles con la espectrometría de masas y, por tanto, requiere una limpieza posterior (Martinez-Maqueda et al, 2012).

El método de extracción debe optimizarse para cada tipo de muestra, y se dispone de diversos mecanismos que se pueden utilizar: disolventes o detergentes orgánicos, nitrógeno líquido, disrupción mecánica (P.ej., el uso de turrax, batidoras, molido manual en un mortero, *beads* de Ballotini), sonicación, y compresión/expansión. El método ha de ser compatible con el método de medición que se use posteriormente y, además, con la cantidad de material que va a ser procesado. Si las mediciones no se van a realizar de inmediato, las muestras de proteína tendrán que almacenarse para minimizar la proteólisis y la agregación/modificación de proteínas. Se recomienda congelar en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Martinez-Maqueda et al, 2012).

La purificación proteica puede incluir uno o varios de los siguientes procesos: (1) procedimientos para clarificar y concentrar proteínas, como la precipitación de proteínas (P.ej., sulfato de amonio, TCA/acetona, cloroformo), centrifugación, filtración (P.ej., diálisis, ultrafiltración) y liofilización; (2) procedimientos para el enriquecimiento, depleción, o fraccionamiento, que reducen la complejidad de la muestra y aumentan la proporción de las proteínas de interés (Martinez Maqueda et al, 2012).

La cromatografía (P.ej., de fase reversa, intercambio catiónico) y la electroforesis en gel de poli-acrilamida (en una o dos dimensiones) son las técnicas de fraccionamiento más empleadas, y también se emplean el isoelectroenfoque *off-gely* la ultracentrifugación. Para la depleción de proteínas de alta abundancia, o el enriquecimiento de las proteínas de interés, se dispone de kits comerciales de depleción basada en inmunoafinidad, aunque los más habituales están orientados a la depleción de las proteínas mayoritarias de plasma y suero (albúmina, IgG, etc). En este sentido, el uso de bibliotecas combinatorias de ligandos peptídicos desplegadas en *beads*, (*combinatorial peptide ligand libraries*, CPLL) tales como ProteoMiner, ha funcionado bien para la compresión del rango dinámico de la concentración de proteínas en muestras de diferente origen. (Cereda et al, 2010; Esteve et al, 2012).

Aunque los procedimientos de depleción y fraccionamiento ofrecen una mejora importante en la sensibilidad global del análisis por espectrometría de masas, dichas estrategias también pueden presentar limitaciones. En el caso del fraccionamiento, las fracciones obtenidas tienen que medirse individualmente, lo que multiplica el número de análisis de espectrometría de masas a realizar; en el caso de la depleción, puede producirse una pérdida de determinadas proteínas, debido a su unión inespecífica a los anticuerpos utilizados para la depleción o a la albúmina (Shi et al, 2012).

Un paso importante en la proteómica *bottom-up* es la digestión de proteínas, la cual se realiza después de la separación por electroforesis de la proteína (digestión “en gel”) para las aproximaciones basadas en gel o, directamente en la mezcla de proteínas sin fraccionamiento previo (digestión “en solución”). Se pueden utilizar muchas enzimas proteolíticas, aunque la tripsina ofrece algunas ventajas gracias a su especificidad de corte. Por estas razones es la proteasa que se usa más comúnmente. Debido a que la duración típica de digestión oscila entre 6 y 24 horas, la digestión de proteínas es el paso que más tiempo consume en el flujo de trabajo proteómico.

Para acelerar la digestión de proteínas y, además, intentar aumentar la eficiencia digestiva, se han propuesto alternativas a los protocolos estándar tales como el uso de microondas, radiación infrarroja, ultrasonidos focalizados de alta intensidad, tripsina modificada, y tripsina inmovilizada (P.ej., en columnas o nanopartículas) (Capelo et al, 2009).

1.13.6.4. Proteómica basada en la espectrometría de masas

Las metodologías electroforéticas presentan ciertas limitaciones, tales como la contraindicación para el análisis de proteínas hidrofóbicas, de mala solubilidad o con alto rango dinámico, y una mayor complejidad y menor reproducibilidad que los métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Por ello, los métodos basados en LC-MS son en la actualidad los preferidos para la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas a gran escala, permitiendo el análisis de miles de proteínas en un experimento. A partir del análisis de los espectros de masas obtenidos, se puede obtener información sobre la secuencia y abundancia de péptidos y proteínas aplicando una gran variedad de herramientas bioinformáticas.

Una elección importante para decidir cómo realizar el análisis en el espectrómetro de masas, es el método para la adquisición de los datos de espectrometría de masas en tándem, dependiendo del objetivo y la fase del estudio.

La aproximación conocida como adquisición dependiente de datos (*data-dependent acquisition*, DDA) es el modo de adquisición más utilizado cuando el objetivo es identificar el número más alto posible de proteínas presentes en una muestra. Sin embargo, utilizando DDA, la detección de péptidos está sesgada hacia aquellos provenientes de las proteínas con mayor abundancia. Para evitar esto, se puede emplear la adquisición independiente de datos (*data-independent acquisition*, DIA).

En este modo de adquirir los datos en el espectrómetro de masas, en vez de seleccionar sucesivamente los iones peptídicos más abundantes, se obtienen, virtualmente, todos los iones de los péptidos presentes, que son fragmentados y analizados.

Esta aproximación goza de popularidad creciente en la actualidad gracias a avances recientes que se han introducido en los instrumentos de espectrometría de masas, tales como la espectrometría de masas de energía elevada (MS^e) (Geromanos et al, 2009) y la adquisición SWATH (*Sequential Window acquisition of All THEoretical mass spectra, SWATH*) (Gillet et al, 2012).

Otro modo de adquisición diferente, que se utiliza en proteómica dirigida (*targeted proteomics*), y que requiere que el péptido o la proteína a monitorizar o cuantificar se conozca de antemano, es el denominado *selected reaction monitoring* (SRM) (Gallien et al, 2011). El SRM constituye el método de elección para la cuantificación de proteínas en cualquier tipo de matriz, debido a su gran sensibilidad y especificidad.

1.13.6.4.1. Espectrometría de masas

Un espectrómetro de masas consiste en tres partes fundamentales: una fuente de iones, como la fuente de ionización por electrospray (ESI) (Fenn et al, 1989) o la fuente de MALDI (*matrix assisted laser-desorption ionization*) (Karas y Hillenkamp, 1988), para producir iones a partir de la muestra; uno o más analizadores de masas, como por ejemplo: el cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (*time of flight*, TOF) o la trampa iónica (*ion trap*, IT), para separar los iones según sus relaciones masa-carga (m/z); y un detector para registrar el número de iones emitidos por el analizador, que producirá los espectros de masas.

El desarrollo de dos técnicas suaves de ionización ESI y MALDI, capaces de llevar moléculas grandes a la fase gaseosa sin afectar su integridad, ha revolucionado el mundo de la proteómica al permitir un análisis a gran escala de miles de proteínas en un solo experimento. En el caso concreto del ESI, se aplica alto voltaje a una mezcla líquida en medio ácido de péptidos que fluyen a través de un capilar estrecho formando un spray eléctrico compuesto de pequeñas gotas con carga. Estas microgotas se evaporan rápidamente hasta que el número de cargas en la superficie se hace muy elevado y sobrepasa el llamado límite de *Rayleigh*, lo cual hace que las gotas exploten para formar microgotas más pequeñas. Este proceso se repite varias veces hasta llegar a la completa desolvatación de los analitos ionizables presentes en la solución. Una de las ventajas de ESI es que, dependiendo de su masa y estructura molecular, los iones pueden adquirir múltiples cargas. Los péptidos tripticos suelen convertirse en iones de doble o triple carga.

En el analizador del espectrómetro de masas, los iones formados en la fuente de ionización se separan según su relación m/z . TOF, cuadrupolos (Q), y trampas de iones son los analizadores de masas más utilizados en proteómica. Los espectrómetros de masas se pueden construir con un solo analizador de masas, o con la combinación de varios. Los instrumentos compuestos de dos o más analizadores de masas acoplados se conocen como espectrómetros de masas

híbridos o en tándem. El *TOF* consiste en un tubo a alto vacío en el que los iones, acelerados por energías iguales, viajan a diferentes velocidades, que son inversamente proporcionales a las masas de los iones (Weickhardt et al, 1996). Así, los iones con valores m/z más pequeños alcanzarán el detector antes que aquéllos con valores m/z más elevados, pudiéndose calcular el valor m/z de un determinado ion a partir del tiempo que tarda en atravesar el tubo de vuelo. Por otra parte, los cuadrupolos consisten en cuatro cilindros paralelos en los que se aplican campos eléctricos oscilantes para estabilizar selectivamente los iones de interés, que pasarán a través del cuadrupolo (Leary y Schmidt, 1996).

Dentro de este campo eléctricamente oscilante, los iones viajan a lo largo de trayectorias complejas y sólo aquéllos con trayectorias estables viajan a lo largo del cuadrupolo y llegan hasta el detector, por lo que frecuentemente se utiliza el cuadrupolo como un filtro de iones que, aplicando los voltajes adecuados, sólo deja pasar a su través el/los iones de interés.

Para obtener información sobre la secuencia de los péptidos, se aplica la técnica de espectrometría de masas en tándem (*MS/MS*), que combina dos fases de espectrometría de masas. Para realizar *MS/MS* se necesitan espectrómetros de masas híbridos, es decir, equipos que combinan al menos dos analizadores. Entre las combinaciones más utilizadas están el *Q-TOF*, el *Q-IT*, el *TOF/TOF*, y el triple cuadrupolo (*QqQ*).

En la *MS/MS*, se aísla un péptido concreto filtrándolo en el primer analizador, se imparte energía a los iones a través de la colisión con un gas inerte, y dicha energía provoca la fragmentación del péptido. Se genera así un espectro de masas de los fragmentos resultantes, lo cual posibilita la reconstrucción de la secuencia aminoacídica del péptido a partir del espectro (Steen y Mann, 2004).

1.14. Biomarcadores

La definición oficial de biomarcador por “*The official US National Institutes of Health*” es: “Parámetro objetivo que se puede medir y evaluar como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuesta farmacológica a una intervención terapéutica” (Biomarkers Definitions Working Group, 2001; Johannsson et al, 2018).

Los requisitos para el análisis de biomarcadores en un sistema biológico (plasma o suero) son tres (Surinova et al, 2011):

1. límite de detección requerido para alcanzar un mínimo de rangos de concentración;
2. Reproducibilidad requerida para medir de forma fiable y consistente múltiples muestras de un ensayo clínico;
3. Rendimiento de las muestras requerido para facilitar el análisis de proteínas a través de ensayos interconectados en amplias cohortes de pacientes.

Se ha generado recientemente un catálogo de proteomas de plasma humano a través del análisis pormenorizado de varios grupos de datos HUPO PPP, así como grupos de datos independientes disponibles a través de la fuente PeptideAtlas. Los autores informan sobre la identidad de 20.679 péptidos definidos de los cuales se infirió un grupo no redundante de 2.003 proteínas a una tasa de falso descubrimiento del 1% (disponible a través de la versión 2010 del Human Plasma PeptideAtlas) (Figura 5).

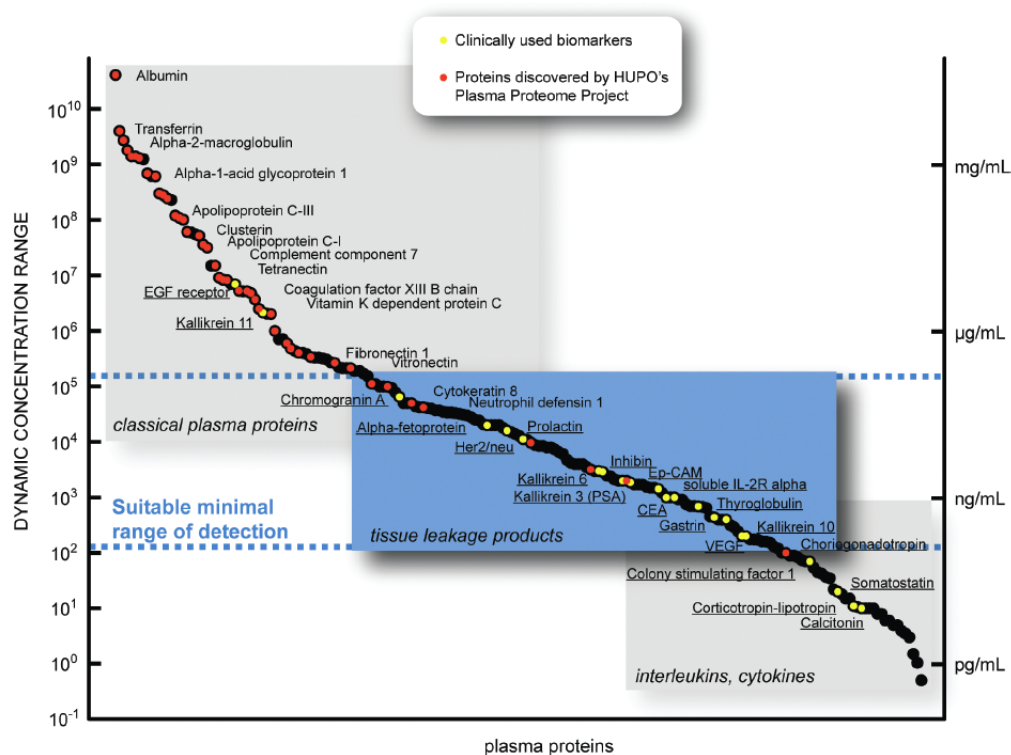


Figura 5. Representación del rango dinámico de concentración de proteínas de plasma y las categorías principales de éstas (Anderson, Anderson, 2002).

Los puntos rojos indican las proteínas identificadas a través del Proyecto del Proteoma Plasmático de HUPO (PPP) (States et al, 2006) y los puntos amarillos representan los biomarcadores que se emplean actualmente en la clínica (Polanski, Anderson, 2007). El rango mínimo adecuado de detección para la selección de biomarcadores en plasma se muestra entre las líneas de puntos. Adaptado de Schiess et al, 2009.

En los últimos años, se han generado largas listas de biomarcadores candidatos para ciertas enfermedades. En la tabla 6 se muestran las etapas que comprende el proceso de desarrollo de biomarcadores.

Tabla 6. Etapas en el desarrollo de un test de biomarcadores (Disponible en Rifai et al, 2006).

Fase	Proceso	Selección de la muestra	Tamaño de la muestra	Duración	Resultados
Fase I- Descubrimiento preclínico	Hipótesis- conducir a la identificación de proteínas candidatas	Modelos de sistemas de estado patológico	10s	6-12 meses	Lista de biomarcadores candidatos
Fase II- Verificación preclínica	Desarrollo de ensayos con proteínas y candidatos para ser probados	Prueba de concepto: sujetos casos y controles	10-50	6-12 meses	Más resultados >> Evaluación de la plataforma analítica. Detección de la enfermedad en el plasma
Fase III- Validación preclínica	Generación de una firma de proteínas para el estudio de las proteínas	Selección retrospectiva con resultados conocidos de la enfermedad	100-500	6-12 meses	Ejecución del panel de biomarcadores; definir criterios de evaluación clínica
Fase IV- Evaluación clínica	Desarrollo ensayo clínico. Determinar la precisión del test	Recopilación prospectiva de la población objeto	500-1000	>24 meses	Sensibilidad y especificidad del test diagnóstico
Fase V- Control de la enfermedad	Definir el impacto de la prueba sobre la población	Selección al azar de la población objeto	>1000	Muchos años	Efecto sobre el manejo de la enfermedad

En la fase de descubrimiento preclínico, para obtener una lista de biomarcadores candidatos, uno de los principales inconvenientes para la identificación de estos es el rango dinámico. El rango mínimo de detección se muestra entre 10^5 y 10^{12} ng/ mL, siendo necesaria la depleción de las proteínas de mayor abundancia (Albúmina, Ig G, etc.)(Rifai et al, 2006).

En la fase de validación preclínica, la mayoría de biomarcadores se somete a validación a través del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Sin embargo, este método se apoya en anticuerpos específicos para las proteínas de interés, que conducen a un proceso de desarrollo caro y largo en el tiempo, además de que en muchos casos los anticuerpos presentan inespecificidad y/o reactividad cruzada (Rifai et al, 2006).

En las fases posteriores como, evaluación clínica y control de la enfermedad, se precisan grandes muestras de pacientes para llevar a cabo el desarrollo clínico, siendo costoso y largo en el tiempo (Rifai et al, 2006).

Los ensayos de proteómica dirigida se suben y almacenan continuamente en la versión SR-MAtlas del *PeptideAtlas* y se pueden recuperar a través de su interfaz web (www.srmatlas.org).

La GH e IGF-1 en suero, son 2 biomarcadores utilizados para medir la acción de la GH tanto en niños como en adultos; ambas se utilizan como herramientas de diagnóstico. La IGF-1 además, es usada para monitorizar los efectos del tratamiento de reemplazo con GH en el DGH (Johannsson et al, 2018; Schilbach et al, 2018).

La IGF-1baja en suero es indicativa de DGH. A diferencia de la secreción de GH endógena, no está sujeta a variaciones diurnas o la pulsatibilidad. El hecho de no encontrar una concentración aumentada de IGF-1 en suero durante el tratamiento con GH puede indicarnos insensibilidad a la GH requiriendo evaluaciones y tratamientos alternativos (Cohen et al, 2010). La IGF-1también se utiliza como marcador de seguridad a largo plazodurante el tratamiento con GH. No existen guías aceptadas que establezcan la concentración de IGF-1 durante el tratamiento con GH en niños con DGH, aunque, ésta debe mantenerse dentro de los rangos normales. Ligeras elevaciones por encima de +2 SD pueden ser aceptables en determinadas circunstancias.

Como ya se ha comentado, la IGFBP-3 en suero, parece predecir la respuesta de la GH o el perfil de seguridad. Datos epidemiológicos señalan que elevadas concentraciones de IGFBP-3 puede reducir el riesgo asociado de sufrir algunos tipos de cáncer relacionados con la IGF-1 (Ali et al, 2003). La concentración de IGF-1 en suero puede ayudar a titular la dosis de GH durante el tratamiento de reemplazo. La dosis de GH durante el periodo de transición suele estar entre la dosis pediátrica y la dosis adulta, con ajustes basados en la concentración de IGF-1. El ensayo de activación del receptor quinasa es una herramienta de investigación útil para medir la IGF-1 activa y determinar con precisión los cambios en las proteínas sensibles a la GH (Chen et al, 2003).

Se han identificado marcadores sensibles a la GH, como: metaloproteinasa 2 y 9, factor de crecimiento endotelial vascular, isoformas de apolipoproteína A-1 y la haptoglobina (Randeva et al, 2004; Cruz-Topete et al, 2011a, b). Su utilidad como biomarcadores debe ser establecida. En un estudio farmacogenómico se han identificado biomarcadores genéticos de respuesta al tratamiento con GH en niños con DGH o Síndrome de Turner (Clayton et al, 2013). Además, niveles circulantes de un fragmento de la degradación del colágeno tipo X, podría proporcionar una herramienta para monitorizar el crecimiento en pacientes pediátricos (Coghlan et al, 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

Aunque el diagnóstico del DGH está basado en una evaluación auxológica, junto con pruebas bioquímicas, maduración ósea, estudios neurorradiológicos y en ocasiones genéticos, existe una controversia importante en su diagnóstico y manejo.

En esta línea las pruebas de estimulación son aceptadas, pero no exentas de discusión, porque sus valores pueden variar significativamente en función del test y ensayo utilizado, creando una dificultad añadida con falsos positivos o negativos, con las consecuencias que esto supondría. Actualmente hay descritos al menos 34 test diferentes (Rochioccioli y Tauber, 1994).

También existe controversia en cuanto al pico de corte de la GH. Hasta años recientes se admitían picos de corte tras diferentes estímulos de secreción de GH de 10 ng/mL, después diferentes Sociedades Científicas han establecido 7,3 ng/mL (Binder, 2011; Binder et al, 2011; Chesover y Dattani, 2016), aunque otros centros utilizan como umbral 7 ng/mL. Recientes estudios de pacientes con DGH orgánico concluyen que los puntos de corte oscilan entre 6.5 ng/mL y 6,8 ng/mL (Guzzetti et al, 2016), según el test provocador utilizado, y además algunos no están exentos de eventos adversos (Shah et al, 1992).

No hay acuerdo en pruebas específicas, los ensayos utilizados son discutibles, no tienen reproducibilidad, así mismo en no pocas ocasiones se ha observado que los niños no deficientes de secreción de GH pueden manifestar test disminuidos y a la inversa, niños con déficit tener pruebas normales.

También, los mediadores GH dependientes tales como, la IGF-1, IGFBP-3, y SAL pueden tener niveles de normalidad en estos pacientes y, al contrario, niños con crecimiento normal manifestar cifras bajas de acuerdo con los estándares de cada medio.

Actualmente para diagnóstico del DGH idiopático no existe ningún marcador específico, aunque las administraciones así lo requieren a través de los test de estímulo de GH. En otras indicaciones, por ejemplo en el Síndrome de Turner, el marcador es un cariotipo 45,X; en el síndrome de Prader-Willi la ausencia de la expresión de un alelo localizado en el brazo largo del cromosoma 15 de origen paterno (concretamente en la región 15q11-q13); en las alteraciones del gen SHOX, este gen se localiza en la zona pseudoautosómica de los brazos cortos de los cromosomas X e Y, sufriendo una delección en algún de los alelos; también en la insuficiencia renal crónica con disminución del filtrado glomerular (IRC definida como filtrado glomerular inferior al 50 %), calculado por método de Schwartz, aclaramiento de creatinina o métodos isotópicos, o del niño pequeño para la edad gestacional que a los cuatro años aún

no ha hecho el crecimiento recuperador (catch-up). Disponible en: <https://www.msssi.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/criteriosHCninos020908.pdf>

Actualmente en la mayoría de los países europeos se siguen utilizando los criterios de diagnóstico clásicos para iniciar el tratamiento de estos pacientes. En un buen número de ellos y en las Comunidades Autónomas de España hay Comités de Expertos para asesorar a las diferentes administraciones para la aceptación o no de la indicación de tratamiento con GH, que requieren de marcadores actualmente en debate.

Ante tanta complejidad para la valoración del DGH, la espectrometría de masas ofrece un futuro prometedor, mediante el estudio de la diferencia en la expresión de proteínas en niños afectados de DGH con el objetivo de identificar marcadores que podrían utilizarse como una herramienta clínica de diagnóstico (Thevis et al, 2010; Arsene et al, 2014).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis conceptual

La complejidad para la valoración del DGH en el niño, ha hecho que la búsqueda de signos tempranos de alarma sea prioritaria para los endocrinólogos pediátricos. En este contexto la aplicación de nuevas metodologías, incluyendo las derivadas de las técnicas ómicas, como es la proteómica, podría ofrecer un futuro prometedor con la identificación de biomarcadores específicos que podrían utilizarse como una herramienta de uso clínico para definir un diagnóstico más preciso.

3.2. Hipótesis operativa

Los niños prepuberales con DGH tendrían un proteoma sérico diferente al de niños que tienen crecimiento normal, y tras un periodo de tratamiento con hormona del crecimiento (GH) recombinante puede variar, asemejándose o no al de los niños con crecimiento normal, haciendo que estas variaciones proteicas no sólo reflejen posibles biomarcadores para el diagnóstico sino que condicionen en estos niños con talla baja los efectos de una posible terapia con GH recombinante en términos de aumento de talla.

3.3. Objetivo general

Determinar posibles biomarcadores diagnóstico del déficit de hormona de crecimiento (DGH) analizando si existen diferencias proteicas de niños DGH comparado con un grupo de niños con crecimiento normal (controles), y valorar si estas supuestas diferencias se mantienen tras iniciar un periodo de tratamiento con hormona recombinante (seis meses) o por el contrario varían asemejándose al grupo de niños control, de similar edad y estado prepúber.

3.4. Objetivos específicos

1. Evaluar a niños con DGH versus controles sanos mediante historia clínica, parámetros antropométricos y bioquímicos.
2. Aplicar la técnica proteómica SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) a muestras de suero de niños control, niños con DGH y esos mismos niños con DGH tras seis meses de tratamiento con GH recombinante. Identificar las proteínas

con cambios estadísticamente significativos en su abundancia entre los tres grupos experimentales.

3. Contribuir al conocimiento de las acciones de la somatotropina sobre el metabolismo de las proteínas.
4. Iniciar una novedosa línea de investigación con las herramientas proteómicas actuales, cuyos resultados permitan en un futuro mejorar la asistencia de los niños con DGH.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental

Es un estudio prospectivo, analítico, observacional de tipo casos y controles. Se llevó a cabo conjuntamente en la Unidad de Endocrinología Pediátrica, el Servicio de Análisis Clínicos (SAC) del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS) de Córdoba, y el Servicio de Proteómica del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

4.1.1. Muestra

Nuestro trabajo se ha proyectado sobre una muestra de 30 pacientes, 15 casos (DGH) y 15 controles.

4.1.2. Sujetos

La muestra está formada por 30 niños prepúberes, de ambos sexos, con diagnóstico o no de DGH. Se dividieron en dos grupos:

- Grupo Control: 15 niños prepúberes con crecimiento normal (V/M: 8/7).
- Grupo Casos: 15 niños prepúberes con diagnóstico de DGH. (V/M: 9/6).

La media de edad fue 9.86 ± 1.15 con un rango de edad comprendido entre 7.08-11.75.

Esta selección la realizó el facultativo especialista en la Unidad de Endocrinología Pediátrica del HURS que habitualmente atiende a pacientes con esta patología. Los niños sanos (controles) fueron derivados de un Centro de Salud para una evaluación rutinaria.

4.1.2.1. Criterios de inclusión

- Obtención de la Firma de Consentimiento Informado para ambos grupos.
- Criterios de diagnóstico: el grupo de casos de DGH lo conformarían niños de sexo masculino o femenino, con edades comprendidas entre los 7 y 11 años, sin signos clínicos ni analíticos de desarrollo puberal (estadio I de Tanner), con patología de DGH de acuerdo a los criterios de la Sociedad de Investigación de la Hormona de Crecimiento (Growth Hormone Research Society, 2000), con un pico de corte tras el test de estímulo de $<7,3$ ng/mL medi-

dos por el ensayo monoclonal. Además, no deberían presentar patologías de base o antecedentes de otra patología ni haber recibido tratamiento médico que pudiera interferir en los resultados analíticos en los 12 meses previos a la inclusión.

- En el grupo de referencia de niños sanos (control) se incluirían aquellos de similar edad a la de los sujetos de DGH seleccionados en el estudio, en estado prepúber, y seleccionados tras descartar ausencia de patología.

4.1.2.2. Criterios de exclusión

- Haber recibido o recibir medicación con efectos secundarios metabólicos como el tratamiento con diuréticos, β -Bloqueantes, β -adrenérgicos, corticoides.
- Presentar infección congénita conocida, anomalías genéticas y malformaciones congénitas o síndromes sin defecto genético conocido.
- Presentar patología intercurrente como criterio de exclusión transitoria.
- Inclusión del mismo paciente más de una vez.
- Estar participando en otro proyecto de investigación (ensayo clínico o similar).

4.1.2.3. Aspectos éticos y consentimientos informados

Este estudio ha seguido los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, así como los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación médica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, en la Ley 14/2007, de julio, de Investigación Biomédica, y además se ajusta a lo establecido en la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales y Reales Decretos que la desarrollan en cuanto a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.

Previamente se obtuvo la aprobación por el Comité de Ética y de Investigación Clínica (CEIC) del HURS de Córdoba (acta núm. 225 referencia 2400). A los potenciales participantes y a sus familiares se les informó sobre el proyecto de investigación objeto de este estudio y se obtuvo el consentimiento informado del tutor o representante legal.

4.2. Métodos

La selección y el control clínico de los sujetos, así como la obtención de muestras (sueros) y la obtención de los parámetros antropométricos se realizó en la Unidad de Endocrinología Pediátrica del HURS; la determinación de las variables clínicas y los factores de crecimiento en el SAC del HURS y los análisis proteómicos en el IMIBIC de Córdoba.

A cada uno de los participantes del estudio, se realizó una historia clínica completa, con exploración física y antropometría y bioimpedanciometría.

Se hizo una extracción sanguínea basal, y se obtuvo suero para la determinación posterior de proteínas.

Todas estas valoraciones se hicieron en los niños con DGH al diagnóstico y tras seis meses de tratamiento con GH. El grupo control solo se evaluó una vez.

En la figura 6 se describe el diseño del estudio en el tiempo.

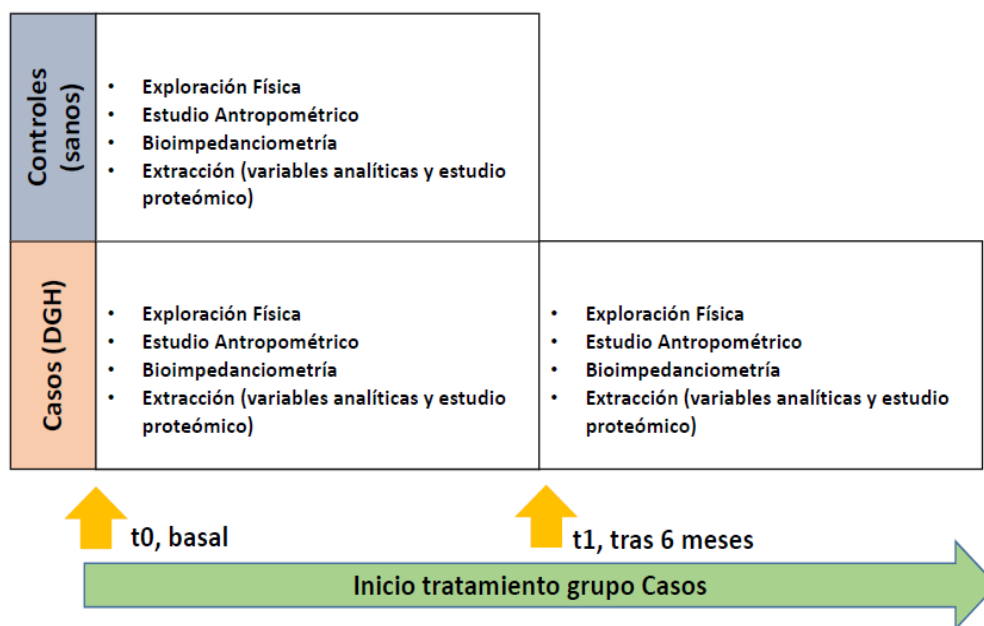


Figura 6. Diseño del estudio en el tiempo.

4.2.1. Historia clínica, exploración física y antropométrica

4.2.1.1. Historia clínica

Inicialmente se realizó una historia clínica en la que se incluyeron antecedentes familiares como: talla de los progenitores, embarazo, parto, o si tenían alguna patología en relación a un trastorno del crecimiento. En los antecedentes personales, se obtuvieron peso y longitud al nacimiento, y se descartaron patologías y tratamientos que fueran excluyentes

4.2.1.2. Antropometría

Se registraron los siguientes parámetros antropométricos: edad, peso (kg), talla (cm), superficie corporal (m²), tensión arterial sistólica y diastólica (mmHg).

- Talla: se recogió mediante un estadiómetro fijo tipo Harpenden con una variación de ± 1 mm. Con el paciente de pie, libre de calzado, con los talones unidos por el eje longitudinal de ambos pies y con un ángulo aproximado de 45° , brazos relajados a ambos lados de cuerpo, la cabeza se colocó de acuerdo al plano de Frankfurt (que une el borde inferior de la órbita de los ojos y el superior del meato auditivo externo). Los tobillos, los glúteos, la parte superior de la espalda y la parte posterior de la cabeza en contacto con la pared vertical. La mirada examinando hacia el frente e invitándolo a estirarse, se colocó el vástago horizontal sobre el vértex del cráneo y se procedió a leer y apuntar la lectura de la estatura, que se registró en cm y mm. Esta maniobra se repitió 3 veces.
- Peso: se obtuvo mediante una báscula SECA con una variación de ± 100 g, con el mínimo de ropa y descalzo, colocando los pies en el centro de la báscula y en forma simétrica a la plataforma, cuidando que no se moviera en el momento de tomar la lectura del peso, el cual se expresiónen kg y g.
- Área de Superficie corporal (ASC). Existen diferentes fórmulas; en este trabajo se utilizóla fórmula de Mosteller:

$$x = \sqrt{\text{peso} * \text{altura} / 3600}$$

- Tensión arterial: se midió la tensión arterial sistólica y diastólica con un esfigmomanómetro manual, en decúbito supino en el brazo izquierdo y tres veces, tomando la media. Los valores obtenidos se expresaron en milímetros de mercurio (mmHg), siguiendo los criterios de la American Heart Association.
- La composición corporal (masa grasa, masa libre de grasa y contenido en agua) con un bioimpedanciómetro TANITA B16.

4.2.1.3. Pruebas de provocación: procedimientos

Se obtuvieron las muestras mediante extracción de la vena antecubital del antebrazo entre las 9 y 10 horas de la mañana. Se realizaron 2 pruebas de estímulo con 1 semana de diferencia entre ambas. A continuación, se describe el test de provocación con clonidina:

- Se coge una vía al paciente y se pone solución de glucosalino.
- Se toma muestra de sangre basal. Se mide tensión arterial.
- Administración de clonidina (0,10-0,15 mg/m² o 5 µg/kg en dosis única vía oral).
- Extracción de sangre a los 0', 30', 60', 90' y 120.
- Medida tensión al finalizar la prueba por la posibilidad hipotensión.

Recomendación: por el efecto hipotensor, se aconseja no realizar actividad física para evitar un cuadro vagal.

A la semana se realiza la prueba de ejercicio y propranolol.

Descripción del procedimiento: En ayunas y tras reposo de 10-12 h:

- 2h antes de realizar el ejercicio físico se administra 1 mg/kg de peso de propranolol v.o.

- Se coloca un catéter para la realización de la punción venosa. A tiempo basal y tras extracción de sangre se procede a realizar 15' de ejercicio físico vigoroso.
- El ritmo de extracción de las muestras de sangre venosa será: basal y a los 30'-45' de finalizar el esfuerzo físico.

Contraindicaciones: el propranolol no debe ser utilizado en pacientes con asma bronquial o broncoespasmo. Si tienen más de 7 años sólo se realiza ejercicio.

Se recogieron muestras de sangre venosa durante el primer año y medio del proyecto.

En los niños con diagnóstico de DGH (casos), se tomaron 3 mL de sangre venosa a Tiempo 0 (basal) y a Tiempo1 (tras 6 meses de tratamiento). En los controles, se realizó una única extracción a Tiempo 0 (basal).

Las muestras de sangre venosa se depositaron en tubo BD-Vacutainer® SST, siguiendo el protocolo de extracción del HURS. Se permitió la formación de coágulo a temperatura ambiente durante 2 horas, centrifugando luego a 3000 x g 10 minutos, a 4°C. El suero resultante se alícuotó en tres muestras y se congeló a -80°C hasta su posterior análisis.

4.2.2. Análisis proteómicos

4.2.2.1. Pretratamiento de muestras y normalización de proteínas

Las muestras de suero o plasma humano son la principal fuente de estudio en proteómica clínica para poder identificar aquéllas que están relacionadas con el diagnóstico o la respuesta al tratamiento. Debido al elevado rango dinámico, de hasta 12 órdenes de magnitud que impide un análisis adecuado, es necesario eliminar las proteínas plasmáticas de mayor concentración.

Por ello, se inició el proceso deplecionando las proteínas mayoritarias: Albumina, IgG, anti-tripsina, IgA, transferrina, haptoglobina y fibrinógeno. Utilizado el Sistema de Eliminación por Afinidad Múltiple Human 7 (Multiple Affinity Removal System Human 7, MARS Hu-7, Agilent). Después, las muestras fueron concentradas utilizando concentradores por centrifugación de 5000 Da (Agilent Technologies).

Preparación de la muestra. Se realizó la depleción con el kit MARS Hu-7 siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se diluyeron 12-14 µL de muestra de plasma humano con el tampón A hasta lograr un volumen final de 200 µL.
2. A continuación, se preparó el cartucho de depleción. Para ello, se retiró la tapa y el tapón y se acopló el adaptador con cierre Luer. Posteriormente, se introdujeron 4 mL de tampón A en la jeringuilla y esta se acopló al cierre Luer. Se añadió el tampón A por el cartucho para preparar la resina y para eliminar cualquier burbuja de aire. Se eliminó con la pipeta, cualquier resto del tampón A que pudiera quedar.

3. Se aplicó la muestra. Para ello se extrajo el adaptador con cierre Luer y se colocó el cartucho en un tubo de recogida de muestras con cuello de rosca; a continuación, se etiquetó el tubo como "F1". Se añadieron 200 μ L de muestra de plasma diluido y se centrifugó durante 1,5 minutos a 100 x g.
4. Se lavó y recogió la fracción de flujo F1. Para ello se añadieron 400 μ L de tampón A a la parte superior del cartucho y se centrifugó durante 2,5 minutos a 100 x g. Se recogió esta fracción en el mismo tubo F1.
5. Se lavó y recogió la fracción de flujo adicional F2 colocando el cartucho en un tubo de recogida nuevo etiquetado como "F2". Se añadieron 400 μ L del tampón A a la parte superior y se centrifugó durante 2,5 minutos a 100 x g. Se recogió esta fracción en el tubo F2.
6. Se extrajo el cartucho del tubo de recogida F2 y se acopló el adaptador con cierre Luer a la parte superior del cartucho.
7. Se llenó la jeringuilla de plástico de 5 mL con 2 mL del tampón B, y se acopló al cartucho por vía del adaptador con cierre Luer. Presionando lentamente el tampón B por el cartucho centrifugó las proteínas de alta abundancia, retenidas en el cartucho, fueron eluidas a un nuevo tubo de recogida.
8. Para el re-equilibrado del cartucho, se acopló la jeringuilla de 5 mL con 4 mL del tampón A al cartucho. Se hizo pasar lentamente el tampón A por el cartucho. De esta forma tenemos el cartucho preparado para otra muestra. Antes de guardarlo, se dejó empapado con tampón A. Se apretaron firmemente ambos tapones del cartucho al cerrarlo y se guardó en la nevera a 2-8°C.

El proceso se repitió 4 veces para cada muestra.

Concentración. Las fracciones F1 y F2 recogidas de la depleción de cada muestra, se concentró hasta unos 300-400 μ L, utilizando para ello concentradores por centrifugación de 5000 Da (Agilent Technologies).

Cada muestra resultante, conteniendo las proteínas de baja abundancia, se congeló a 80°C hasta su análisis posterior.

4.2.2.2. Precipitación proteica y cuantificación de proteína total

Las muestras fueron sometidas a precipitación proteica mediante ácido tricloroacético (TCA)-acetona. Esta consistió en un primer paso de incubación de cada muestra con ácido tricloroacético al 10% durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las muestras se sometieron a centrifugación a 13.200 rpm durante 5 min. El *pellet* resultante se sometió a un segundo paso de incubación con 1 mL de acetona fría durante toda la noche, a -18 °C. A continuación, las muestras se centrifugaron de nuevo a 13.200 rpm durante 10 min a 4 °C, y el *pellet* resultante se resuspendió en detergente RapiGest SF (Waters) al 0,2% en bicarbonato amónico 50 mM. La cantidad de proteína total se cuantificó en cada muestra mediante el método fluorimétrico Qubit Assay (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.2.3. Digestión de proteínas

50 µg de cada muestra se sometieron a digestión con tripsina siguiendo el protocolo RapiGest de Vowinckel et al. 2013

La digestión comprende tres pasos:

1. Incubación con 2,5 µL ditioneitol (DTT) 50 mM en bicarbonato amónico 50 mM, durante 30 minutos a 60°C. Agente reductor que rompe los puentes disulfuro.
2. Incubación con 2,8 µL iodoacetamida (IAA) 100 mM en bicarbonato amónico 50 mM, durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad para evitar su degradación. Agente alquilante, cuyo grupo alquilo es transferido.
3. Digestión con tripsina.

Como la tripsina es activa a pH básico, se comprobó con tiras reactivas de pH, que éste estaba entre 8,0-8,5.

Existen distintos protocolos de digestión con tripsina. En el protocolo utilizado, esta se añade en dos etapas:

- 3.a. En proporción 1:40 con la proteína total a digerir (por tanto, 1,25 µg) e incubación en estufa durante 2 horas a 37 °C.
- 3.b. A continuación, se vuelve a añadir la misma cantidad de tripsina y se incuba a 37°C durante 16 horas.

La digestión se detiene añadiendo 2,13 µL ácido trifluoroacético (TFA) al 10%. Tras ello, se ajusta con agua y con acetonitrilo de modo que la concentración final de péptidos será de 0,5 µg/µL, y la de acetonitrilo 2,25% y TFA 0,2%.

Se trasladan las muestras de péptidos de los tubos eppendorf en los que se ha realizado la digestión a viales de HPLC para su análisis por LC-MS. Se añadió en cada muestra 1 µL de los péptidos iRT 10x (Biognosys AG, Schlieren/Zürich, Switzerland).

4.2.2.4. Análisis LC-MS

4.2.2.4.1. Creación de la librería espectral

Las soluciones peptídicas fueron analizadas mediante nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS), siguiendo una aproximación DDA orientada a la identificación masiva de las proteínas presentes en las muestras (aproximación también conocida como "shotgun").

Las muestras se combinaron en "pools" de 5 muestras, para obtener datos representativos de los péptidos y proteínas presentes en todas las muestras a analizar (Tabla 7).

Tabla 7. Muestras incluidas en el estudio, distribución de muestras en cada grupo, y distribución de las muestras en “pools”.

Código muestra	Grupo	“Pool” para las carreras DDA
def_1-1	GH déficit basal	A-1
def_2-1	GH déficit basal	A-1
def_37-1	GH déficit basal	A-1
def_38-1	GH déficit basal	A-1
def_45-1	GH déficit basal	A-1
def_46-1	GH déficit basal	B-1
def_47-1	GH déficit basal	B-1
def_49-1	GH déficit basal	B-1
def_50-1	GH déficit basal	B-1
def_51-1	GH déficit basal	B-1
def_52-1	GH déficit basal	C-1
def_53-1	GH déficit basal	C-1
def_54-1	GH déficit basal	C-1
def_55-1	GH déficit basal	C-1
def_56-1	GH déficit basal	C-1
def_1-2	GH déficit tras tratamiento	A-2
def_2-2	GH déficit tras tratamiento	A-2
def_37-2	GH déficit tras tratamiento	A-2
def_38-2	GH déficit tras tratamiento	A-2
def_45-2	GH déficit tras tratamiento	A-2
def_46-2	GH déficit tras tratamiento	B-2
def_47-2	GH déficit tras tratamiento	B-2
def_49-2	GH déficit tras tratamiento	B-2
def_50-2	GH déficit tras tratamiento	B-2
def_51-2	GH déficit tras tratamiento	B-2
def_52-2	GH déficit tras tratamiento	C-2
def_53-2	GH déficit tras tratamiento	C-2
def_54-2	GH déficit tras tratamiento	C-2
def_55-2	GH déficit tras tratamiento	C-2
co_5	control	Control-A
co_7	control	Control-A
co_12	control	Control-A
co_14	control	Control-A
co_15	control	Control-A
co_16	control	Control-B
co_25	control	Control-B
co_26	control	Control-B
co_29	control	Control-B
co_30	control	Control-B
co_34	control	Control-C
co_35	control	Control-C
co_36	control	Control-C
co_38	control	Control-C
co_39	control	Control-C

Un μg de cada muestra combinada (2 μL) se inyectó en un sistema nLC Ekspert nLC415 (Eksigent, Dublin, CA, USA), utilizando una columna Acclaim PepMap C18 (75 μm x 25 cm, 3 μm , 100 Å) (Thermo Fisher Scientific) con una velocidad de flujo de 300 nL/min. Se utilizaron como solventes A y B, agua y ACN, respectivamente, ambos conteniendo 0.1% de ácido fórmico. El gradiente cromatográfico consistió en un aumento del 5% al 30% de B en 120 min, 10 min con un 90% B, y 20 min con 5% B para reequilibrar la columna. El tiempo total de ejecución es de 150 minutos.

Conforme los péptidos van siendo eluidos, son inyectados directamente en un espectrómetro de masas Q-TOF modelo TripleTOF 5600+ (Sciex, Redwood City, CA, USA). Se empleó como fuente de ionización para la interfaz entre nLC y el espectrómetro de masas, una fuente NanoSpray III ESI (Sciex), aplicando un voltaje de 2600 V.

El espectrómetro de masas se programó para operar con un método de adquisición DDA 'top 65' utilizando la modalidad de ion positivo.

Este modo de adquisición consistió en un survey MS scan de 250 ms de 350 a 1250 m/z, seguido por un MS/MS scan de 230 a 1700 m/z (60 ms de tiempo de adquisición, energía de colisión *rolling collision energy*) de los 65 iones precursores más intensos derivados del survey scan, en un ciclo total de 4.2 s. Los precursores fragmentados se añadieron a una lista de exclusión dinámica durante 15 s; los iones monocarga fueron excluidos del análisis MS/MS.

La identificación de péptidos y proteínas se efectuó utilizando el motor de búsqueda Protein Pilot (version 5.0.1, Sciex) utilizando la base de datos de secuencias de proteínas humanas Swiss-Prot (descargada en marzo 2016) conteniendo 20,200 secuencias de proteínas, marcando iodoacetamida como agente alquilante de las cisteínas.

Se fijó una tasa de descubrimientos falsos (*false discovery rate*, FDR) del 1% tanto para péptidos como proteínas. El resultado de la identificación (asociación espectro MS/MS con péptido y con proteína) se utilizó para generar la librería espectral utilizando el módulo MS/MS ALL with SWATH acquisition MicroApp (version 2.0, Sciex), integrado en el software PeakView (versión 2.1, Sciex). Los péptidos con un valor de confianza por encima del 99%, tal y como son reportados por Protein Pilot, fueron incluidos en la librería espectral.

4.2.2.4.2. Cuantificación relativa mediante SWATH

Un μg de cada muestra (2 μL) se analizó utilizando la misma configuración nLC-MS y el mismo gradiente de nLC que el utilizado para construir la librería espectral, pero en este caso utilizando un método de adquisición DIA, concretamente SWATH.

En este método, el rango de masas oscila entre 400 a 1250 para el scan inicial MS TOF donde los precursores son registrados, y de 230 a 1500 para el scan MS/MS donde los fragmentos iónicos son registrados. Por lo tanto, este método consiste en repetir un ciclo compuesto de un scan MS (400-1250 m/z) de 50 ms, seguido de 50scans MS/MS de 96 ms (230-1500 m/z,

aislamiento de los precursores en 50 ventanas de anchura variable cubriendo el rango 400-1250 m/z). El rango de m/z para el MS inicial es el mismo que el utilizado en las ventanas de aislamiento (400-1250 m/z).

La extracción de los cromatogramas de los fragmentos de cada péptido se realizó por PeakView (versión 2.1) empleando el módulo MS/MSALL with SWATH Acquisition MicroApp (versión 2.0). Esta aplicación procesó las carreras SWATH empleando la biblioteca de espectros creada en el paso anterior a partir de las identificaciones obtenidas de las carreras DDA. Se seleccionaron hasta diez péptidos por proteína y siete fragmentos por péptido en función de la intensidad de la señal; se excluyeron del proceso los péptidos compartidos y modificados. Para la extracción de los cromatogramas iónicos, se emplearon ventanas de 20' y tolerancias de 20 ppm. Los tiempos de retención de los péptidos identificados fueron realineados en cada carrera utilizando como calibrantes los tiempos de retención de los péptidos iRT añadidos a cada muestra. Se generaron así cromatogramas para cada ión fragmento seleccionado, midiéndose las áreas cromatográficas para cada fragmento. Se obtuvieron las áreas para los péptidos mediante la suma de áreas a partir de los iones fragmento correspondientes al mismo péptido. PeakView computó un FDR y una puntuación (score) para cada péptido asignado según componentes cromatográficos y componentes espectrales, y se emplearon solamente los péptidos con un FDR por debajo del 5% para la cuantificación de proteínas. Los valores cuantitativos de las proteínas se calcularon mediante la suma de las áreas de los péptidos correspondientes a la misma proteína.

4.2.3. Estudio estadístico de datos

4.2.3.1. Análisis de los datos antropométricos

Para el análisis estadístico de las variables clínicas, se ha realizado la prueba de normalidad a las variables, en este caso hemos utilizado Shapiro-Wilk. Si sale significativa se aplicó un test no paramétrico (U de Mann Whitney) y si no sale significativo se aplicó una prueba paramétrica (t de Student). En el caso de optar por la prueba t de Student además de la normalidad tiene que cumplir la homogeneidad de las varianzas, lo cual se hace con el test de Levene, el propio programa nos da dos resultados en función de si lo cumple o no. Si el valor de p es menor de 0,05 para los test, se considera que es significativamente diferente entre los grupos de estudio. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 20.0.

Cuando la variable es categórica (ej. sexo), se calcula si hay algún sesgo porque uno de los sexos esté más presente en alguno de los dos grupos. Aquí se calculó si había significativamente más niños en el grupo casos que en el grupo control, midiendo la asociación entre la variable de estudio (sexo) y los grupos de estudio.

4.2.3.2. Análisis de los datos proteómicos

4.2.3.2.1. Abundancia relativa de cada proteína

Los valores cuantitativos de las proteínas se normalizaron empleando MarkerView (versión 1.2.1, Sciex). Los valores de cambio (fold-change) para cada proteína se obtuvieron dividiendo la media de los valores normalizados para un grupo respecto a la media de los valores normalizados para el otro grupo. A continuación, se testó la abundancia diferencial de cada proteína aplicando:

- para el primer experimento (Control basal versus DGH basal) el test de Mann-Whitney.
- para el segundo experimento (DGH basal versus DGH 6 meses) se utilizó el test de Mann-Whitney pareado.

Para la estimación del valor q para el control FDR se utilizó el paquete *qvalue* R (Storey et al, 2015).

4.2.3.2.2. Selección de los mejores biomarcadores potenciales

Para seleccionar aquellas proteínas que discriminan mejor entre sujetos con DGH vs controles, se aplicó un flujo de trabajo de *feature selection*, incluyendo tres algoritmos de clasificación diferentes, empleando el paquete de R *bootfs* (Sonntag et al, 2014). Se analizaron los niveles de abundancia de todas las proteínas cuantificadas a partir de la combinación de tres algoritmos: Random Forest-Boruta (RF-Boruta), smoothly clipped absolute deviation-support vector machines (SCAD-SVM), y el análisis de predicción de microarrays (PAM), los cuales produjeron un *ranking* de las proteínas en función de lo bien que cada una de ellas clasifica una muestra en el grupo correcto. Se implementó este proceso de *feature selection* con un *bootstrapping* de 100 iteraciones, y se repitió el proceso 20 veces. Para poder evaluar la capacidad clasificadora de las proteínas (la capacidad de diferenciar entre ambos grupos), y obtener un panel de potenciales biomarcadores con el mínimo número de proteínas y el mejor rendimiento clasificatorio, se realizó un análisis ROC para las 10 mejores proteínas, y sus combinaciones dos a dos y tres a tres, en función de los resultados del análisis de *feature selection*. El área bajo la curva (AUC) se obtuvo empleando el paquete de R *pROC* (Robin et al, 2001).

4.2.3.2.3. Análisis pathway y análisis de Gene Ontology

A partir de los datos de cuantificación relativa, se analizaron las rutas biológicas significativamente afectadas y los componentes de *Gene Ontology* (GO) empleando el software *iPathway-Guide* (Advaita Bio, <http://www.advaitabio.com/ipathwayguide>). El p-valor final para cada ruta metabólica fué calculado utilizando el método de Fisher seguido de corrección FDR.

4.3. Base de datos. Funcionalidad de proteínas

Las bases de datos facilitan información diversa incluyendo información básica sobre la secuencia, localización, nombre del gen, organismo, etc. e información específica, relacionada con la función o tipo de enfermedad.

Existen diferentes bases de datos de proteínas. Las principales son:

- Uniprot (<http://www.uniprot.org/>)
- Swiss-Prot
- PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)
- MMDB (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB/mmdb.shtml>)
- SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>)

Para este trabajo, se ha utilizado el Universal Protein Resource (UniProt) que es una base de datos de proteínas gratuita, muy utilizada por la comunidad científica. Se puede acceder a ella a través de la página web: <http://www.uniprot.org/> (The UniProt Consortium, 2017).

Los datos facilitados en esta base de datos provienen principalmente de: UniProt Knowledgebase (UniProtKB), Proteomes, UniProt Reference Clusters (UniRef), y el UniProt Archive (UniParc). UniProtKB es la plataforma central para toda la información funcional sobre las proteínas. Consiste en dos secciones: la sección revisada (Swiss-Prot) que contiene entradas con apuntes de expertos, y la sección sin revisar (TrEMBL) que contiene entradas anotadas automáticamente por computador (Pundir et al, 2017).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis datos demográficos y antropométrico

En las siguientes tablas se describen los resultados en relación a sexo y datos antropométricos durante el estudio en ambos grupos. Se encontraron diferencias significativas para las variables peso, talla y superficie corporal entre los grupos DGH basal y Controles basales (Tabla 8); y entre el grupo DGH tras 6 meses de tratamiento *versus* el grupo control a tiempo basal (Tabla 9). En la tabla 10 se presentan los datos comparando el grupo DGH a tiempo basal sin tratamiento, y tras 6 meses de tratamiento con GH.

Tabla 8. Medidas antropométricas de niños con DGH (Casos) y Controles prepuberales a tiempo basal.

Variables	Casos (DGH) basal	Control basal	p
Sexo (V/M)	9/6	8/7	0,713
Peso (Kg)	26,21±03,95	34,90±09,46	<0,001
Talla (cm)	125,77±07,96	138,65±4,57	<0,001
Superficie corporal (cm)	00,96±00,10	01,15±00,15	<0,001
TAS (mmHg)	102,93±10,47	108,60±07,02	0,093
TAD (mmHg)	62,60±10,95	65,60±09,42	0,428

V: varón; M: mujer; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; SD: desviación estándar. Los resultados se expresan en las diferentes unidades de medida como media±SD. Significación p<0.05.

Tabla 9. Medidas antropométricas de los casos (DGH) tras 6 meses de tratamiento y Controles prepuberales a tiempo basal.

Variables	Casos (DGH)6 meses	Control Basal	p
Sexo (V/M)	9/6	8/7	0,713
Peso (Kg)	27,85±4,40	34,90±09,46	0,002
Talla (cm)	130,09±6,81	138,65±4,57	0,001
Superficie corporal (cm)	1,00±00,10	01,15±00,15	0,001
TAS (mmHg)	105,60±8,53	108,60±07,02	0,302
TAD (mmHg)	62,60±6,70	65,60±09,42	0,323

V: varón; M: mujer; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; SD: desviación estándar. Los resultados se expresan en las diferentes unidades de medida como media±SD. Significación p<0.05.

Tabla 10. Medidas antropométricas de los casos (DGH) tras 6 meses de tratamiento y Casos (DGH) prepuberales a tiempo basal.

Variables	DGH basal	DGH 6 meses	p
Sexo (V/M)	9/6	9/6	-
Peso (Kg)	26,21±03,95	27,85±4,40	<0,001
Talla (cm)	125,77±07,96	130,09±6,81	<0,001
Superficie corporal (cm)	00,96±00,10	1,00±00,10	<0,001
TAS (mmHg)	102,93±10,47	105,60±8,53	0,296
TAD (mmHg)	62,60±10,95	62,60±6,70	0,758

V: varón; M: mujer; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; SD: desviación estándar. Los resultados se expresan en las diferentes unidades de medida como media±SD. Significación p<0.05.

5.2. Análisis shotgun y creación de bibliotecas de espectros

Las 44 muestras se combinaron en 6 “pools” de 5 muestras cada uno (Tabla 7) y se sometieron a un análisis “shotgun” con el fin de crear una biblioteca de espectros. Como resultado, se identificaron 297 proteínas y 9.214 péptidos (Tasa de Descubrimientos Falsos (FDR) < 1% tanto de proteínas como de péptidos); la lista de proteínas identificadas se muestra en la Tabla Suplementaria S1 (disponible en el CD). Los espectros MS/MS identificados se recopilaron en una biblioteca de espectros que contenía 286 proteínas.

5.3. Análisis SWATH

Mientras que el método SWATH generalmente emplea una anchura de ventana fija de 25 m/z para filtrar los iones en el primer cuadrupolo (Q1), se han demostrado los beneficios de emplear ventanas de m/z variable, en función de la densidad iónica de cada región de m/z, para mejorar la identificación y cuantificación de péptidos (Zhang et al, 2015). Se empleó la densidad iónica hallada en las carreras DDA para optimizar la anchura de las ventanas de extracción en Q1 del método SWATH, lo cual condujo a 50 ventanas de anchura variable (Figura 7 y Tabla Suplementaria S2 (disponible en el CD)). Se emplean ventanas Q1 más pequeñas en las regiones m/z densas donde hay muchos precursores peptídicos, mientras que las ventanas más anchas se emplean en las regiones m/z con menos precursores, por lo que la especificidad aumenta a la par que se mantiene la cobertura del rango de masa total.

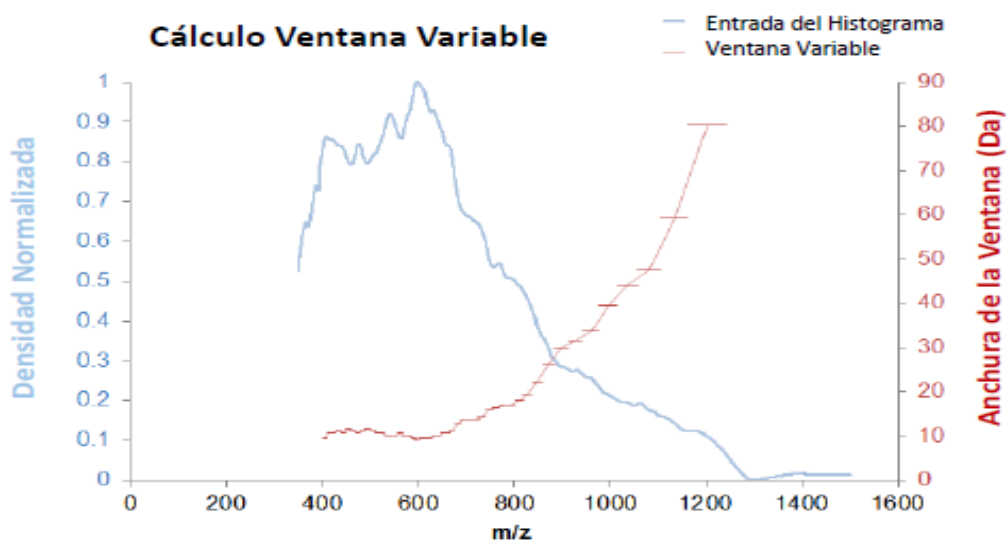


Figura 7. Densidad iónica obtenida a partir de las pruebas DDA y anchura de ventana empleada para el método de adquisición SWATH.

De las carreras SWATH, y utilizando la librería de espectros obtenida, se extrajeron las trazas cromatográficas de los fragmentos iónicos para las 45 muestras, empleando el procedimiento descrito más arriba (hasta diez péptidos por proteína y siete fragmentos por péptido, excluyendo los péptidos modificados). El análisis consiguió extraer la información cuantitativa de los fragmentos iónicos de los péptidos correspondientes a 263 y 274 proteínas para las comparaciones de niños del grupo DGH a tiempo basal (DGH t0) vs controles sanos y de niños con tratamiento (DGH t6) vs niños DGH t0, respectivamente. Los valores de la cuantificación normalizada de estas proteínas se incluyen en las tablas suplementarias S3 y S4, respectivamente (disponibles en el CD).

5.4. Cambios en abundancia proteica entre enfermos (DGH) y controles sanos

Los *fold-changes* (cambios en la proporción) hallados para todas las proteínas cuantificadas se muestran en la Tabla Suplementaria S5 (disponible en el CD), así como los valores estimados de p para Man-Whitney y q para FDR. Ciento veintiún proteínas mostraron un p-valor por debajo de 0,05 y de estas 35 proteínas presentaron un *fold-change* superior a 2 (o menor de 0,5), con un aumento en la abundancia en 21 proteínas y una disminución de la abundancia en 14 proteínas en el grupo con DGH (Tabla 11). Los niveles de expresión para las 121 proteínas significativas se visualizaron en un *heat map* basado en un análisis bidireccional de agrupamiento jerárquico, que separó las muestras analizadas en dos grupos – el grupo con DGH y el grupo de control – con tan sólo dos falsos positivos (muestras co_7 y co_5) (Figura 8).

Tabla 11. Proteínas mostrando una diferencia significativa en abundancia y un *fold-change* superior a 2,0 (o inferior a 0,5) entre el grupo con DGH y el grupo de control.

Código de proteína	Proteína	Fold-change entre DGH y control	p-valor Mann-Whitney	q-valor corrección FDR
Q92496	FHR4	5.99	2.80E-05	0.0004
P02042	HBD	5.93	6.71E-04	0.0021
P68871	HBB	5.43	2.82E-03	0.0067
P69905	HBA	4.61	3.23E-03	0.0073
P02751	FINC	3.75	4.81E-05	0.0004
P02452	CO1A1	3.75	4.02E-05	0.0004
P01880	IGHD	3.67	1.05E-03	0.0032
P02775	CXCL7	3.30	5.05E-06	0.0004
P00915	CAH1	3.14	1.87E-03	0.0049
P00918	CAH2	2.84	5.45E-03	0.0109
P11597	CETP	2.83	4.02E-05	0.0004
P07996	TSP1	2.75	2.80E-05	0.0004
P02776	PLF4	2.71	9.07E-06	0.0004
P09486	SPRC	2.58	1.10E-05	0.0004
P62987	RL40	2.46	2.79E-02	0.0334
Q15063	POSTN	2.43	1.15E-04	0.0007
P06703	S10A6	2.27	1.14E-02	0.0177
P30043	BLVRB	2.26	6.19E-03	0.0117
Q15485	FCN2	2.23	2.23E-04	0.001
P22105	TENX	2.16	3.36E-05	0.0004
P32119	PRDX2	2.03	8.97E-03	0.0154
P02654	APOC1	0.42	2.02E-02	0.0263
P01861	IGHG4	0.34	3.81E-02	0.0431
P02655	APOC2	0.34	4.21E-02	0.0465
P05062	ALDOB	0.33	1.01E-02	0.0171
Q13790	APOF	0.32	2.80E-05	0.0004
P06727	APOA4	0.31	2.80E-05	0.0004
P02656	APOC3	0.27	6.19E-03	0.0117
P55056	APOC4	0.24	1.60E-04	0.0008
P02741	CRP	0.17	1.81E-02	0.0245
P02675	FIBB	0.07	1.62E-03	0.0044
P02679	FIBG	0.07	1.44E-02	0.0204
P02671	FIBA	0.05	1.94E-05	0.0004
P0DJ18	SAA1	0.03	5.76E-04	0.002
P0DJ19	SAA2	0.03	1.36E-04	0.0008

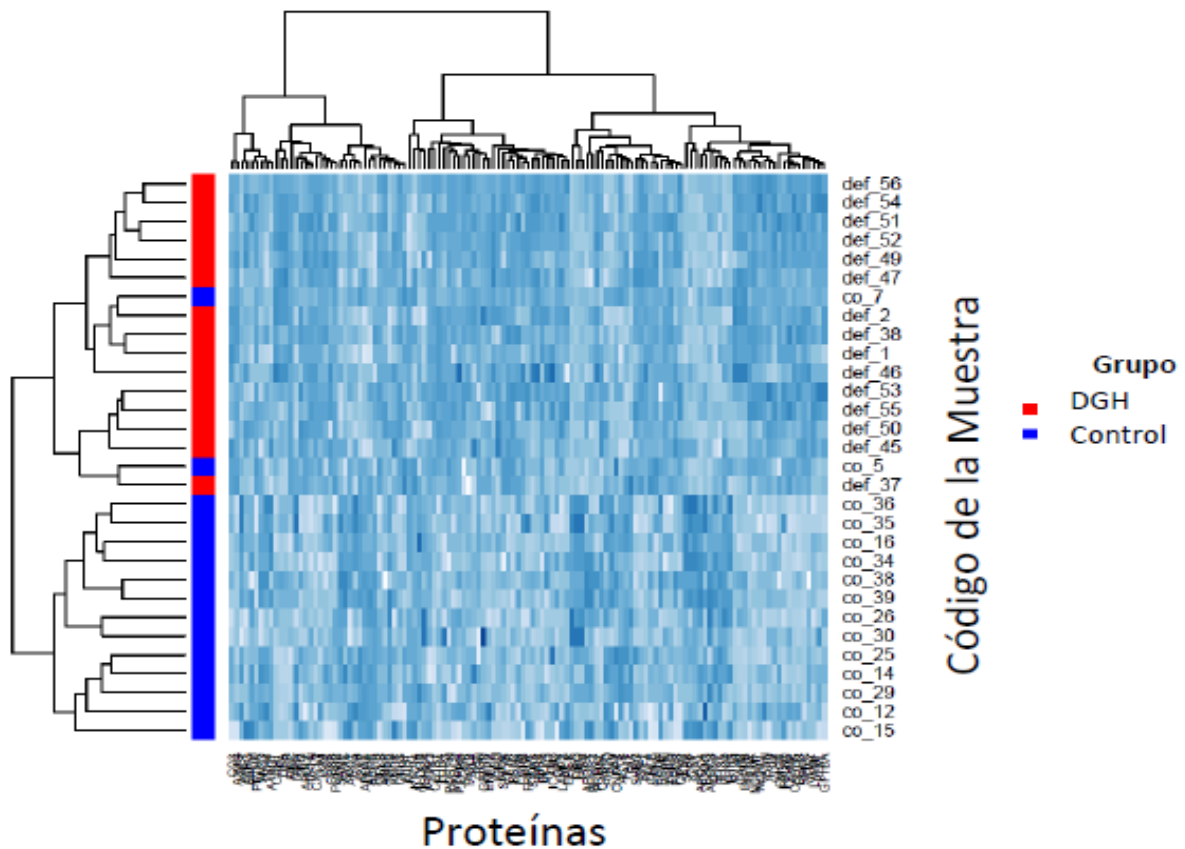


Figura 8. Heat Map y agrupamiento no supervisado de los 30 sujetos analizados empleando las 121 proteínas de suero cambiando en abundancia a partir del test de Mann Whitney según la medición por SWATH del primer experimento.

Los sujetos con DGH y del grupo de control se muestran en rojo y azul respectivamente.

5.5. Cambios en abundancia proteica en niños con DGH tras tratamiento vs DGH al diagnóstico

A continuación, se compararon las muestras (sueros) de los niños con DGH t6 vs los niños con DGH t0 para ver si existían diferencias estadísticamente significativas en la abundancia proteica.

Para evaluar la variación de las proteínas se ha utilizado el test no paramétrico para muestras pareadas de Wilcoxon. Se obtuvieron 39 proteínas con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 12). Los datos del cambio de abundancia (fold-change y estadística) para el total de proteínas cuantificadas se incluye en la Tabla Suplementaria S6 (disponible en el CD).

Tabla 12. Proteínas con diferencias estadísticamente significativas en abundancia tras 6 meses de tratamiento con GH (DGH t6) vs DGH basal (t0).

Código de proteína	Proteína	Fold-change entre DGH t6/DGH basal t0	Valor p Wilcoxon	Valor q
P02751	FINC	0,62302012	0,001097051	0,150296
P11464	PSG1	0,26538416	0,001097051	0,150296
Q13790	APOF	2,33896142	0,002097643	0,1915847
P55056	APOC4	3,47593747	0,003880474	0,1940073
Q96KN2	CNDP1	1,72507034	0,003880474	0,1940073
P07477	TRY1	0,73700103	0,004728922	0,1940073
Q9HDC9	APMAP	1,51565734	0,006946698	0,1940073
P04003	C4BPA	0,42057895	0,006946698	0,1940073
P24592	IBP6	1,75304476	0,006946698	0,1940073
P02649	APOE	1,68033387	0,008373849	0,1940073
P23142	FBLN1	0,72181229	0,0100578	0,1940073
Q15485	FCN2	0,73809487	0,0100578	0,1940073
P11226	MBL2	0,56180181	0,0100578	0,1940073
P05543	THBG	0,86302317	0,0100578	0,1940073
P05090	APOD	1,53959265	0,01203695	0,1940073
P02749	APOH	1,23524475	0,01203695	0,1940073
P08185	CBG	0,79406507	0,01203695	0,1940073
P06727	APOA4	2,63778053	0,01435389	0,1966483
P12259	FA5	1,28472267	0,01435389	0,1966483
P05019	IGF1	1,82139955	0,01435389	0,1966483
P08709	FA7	0,62142285	0,01705563	0,2031844
P00740	FA9	1,3632882	0,01705563	0,2031844
P02765	FETUA	0,84378672	0,01705563	0,2031844
P01019	ANGT	1,35437574	0,02019367	0,2213226
P01880	IGHD	0,3219366	0,02019367	0,2213226
Q16610	ECM1	0,84391157	0,02382415	0,2510698
P61769	B2MG	1,20938716	0,02800782	0,2558047
O43866	CD5L	0,58111656	0,02800782	0,2558047
P02671	FIBA	1,57450556	0,02800782	0,2558047
Q12913	PTPRJ	0,718748	0,02800782	0,2558047
P02654	APOC1	2,02163686	0,03281002	0,2724226
O14791	APOL1	0,82383798	0,03281002	0,2724226
P20851	C4BPB	0,4994646	0,03281002	0,2724226
P01024	CO3	0,88305898	0,03830053	0,2998384
P04278	SHBG	0,71526664	0,03830053	0,2998384
P02760	AMBP	0,89633256	0,04455332	0,3130156
Q92496	FHR4	0,57303452	0,04455332	0,3130156
Q5SYB0	FRPD1	0,78397352	0,04455332	0,3130156
P35527	K1C9	0,45485787	0,04455332	0,3130156

Tras comparar ambos experimentos (DGH basal vs control y DGH t6 vs DGH basal) encontramos que, de las 121 proteínas alteradas como consecuencia del DGH, 30 de ellas se alteran como efecto del tratamiento sustitutivo con GH tras seis meses, mientras que 91 de ellas no varían como efecto del tratamiento con GH. Por otro lado, encontramos nueve proteínas que no estando alteradas en DGH basal, tras el tratamiento cambian(Figura.9).

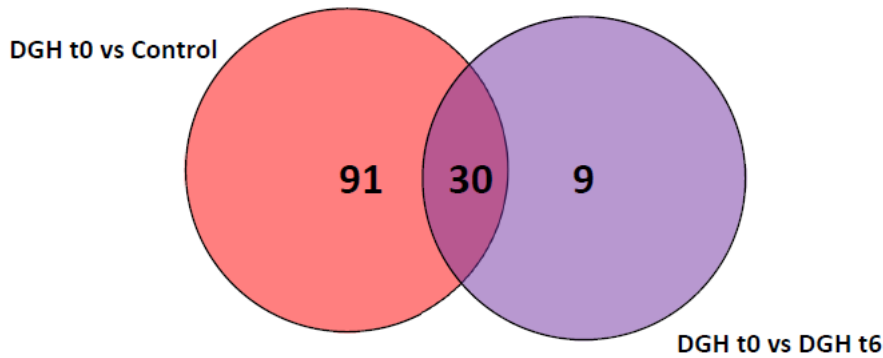


Figura 9. Proteínas presentando abundancia diferencial en las dos comparaciones, DGH basal vs Control, y DGH t6 (tratamiento con GH durante 6 meses) vs DGH basal.

5.6. Identificación de proteína que se corrigen tras tratamiento con GH

Para identificar aquellas proteínas cuyos niveles se están corrigiendo por el efecto del tratamiento con GH, comparamos los *fold-change*, identificando aquéllas que tienen un cambio de signo de *fold-change* (>1 a <1 ó de <1 a >1), encontrando este cambio en todas excepto la ECM1(Tabla 13). Dentro de las 30 proteínas que presentan cambios significativos tanto como resultado de la enfermedad como por efecto del tratamiento con GH, aquellas cuyos niveles se estén corrigiendo como resultado del tratamiento presentaran un cambio en la dirección del *fold-change* en las dos comparaciones. Es decir, aquellas proteínas que presenten un *fold-change* DGH basal/control mayor a 1, deberán tenerlo menor a 1 en la comparación DGH t6/DGH basal para que podamos decir que el tratamiento con GH está revirtiendo el efecto de la enfermedad.

Tabla 13. Valores de *fold-change* DGH basal/control y valores de *fold-change* DGH t6 vs DGH t0 para cada una de las 30 proteínas que se han alterado tras el tratamiento y DGH basal vs Control.

Proteína	Fold-change DGH basal/control	Fold-change DGH t6/DGH basal
FA5	0.827511273	1.284723
APOC4	0.24347845	3.47593747
SHBG	1.552227303	0.71526664
C4BPA	1.674983275	0.42057895
FIBA	0.049639225	1.57450556
B2MG	0.538254427	1.20938716
IGHD	3.666360887	0.3219366
FBLN1	1.405275537	0.72181229
FHR4	5.989561566	0.57303452
FRPD1	1.254844291	0.78397352
APOL1	1.471641704	0.82383798
APOD	0.630700225	1.53959265
THBG	1.250650662	0.86302317
ANGT	0.744820612	1.35437574
FA7	1.518055417	0.62142285
FA9	0.558285436	1.3632882
FINC	3.75277001	0.62302012
AMBP	1.252540669	0.89633256
CNDP1	0.566497879	1.72507034
PTPRJ	1.414841576	0.718748
CBG	1.369833389	0.79406507
APOC1	0.417392145	2.02163686
FETUA	1.391539906	0.84378672
ECM1	0.840678296	0.84391157
APOF	0.319283132	2.33896142
CO3	1.173351001	0.88305898
APOE	0.588805334	1.68033387
APOA4	0.31167075	2.63778053
FCN2	2.226656651	0.73809487
APOH	0.881340994	1.23524475

Además, 9 proteínas que no cambiando en DGH durante el periodo basal, tras el tratamiento se modifican (Tabla 14).

Tabla 14. Proteínas que no estando cambiadas en el periodo basal DGH t0, se modifican tras 6 meses de tratamiento con GH.

Accesión de proteínas	Proteína	Fold-change entre DGH t6/DGH basal t0	Valor p Wilcoxon	Valor q
P11464	PSG1	0,26538416	0,001097051	0,150296
P07477	TRY1	0,73700103	0,004728922	0,1940073
Q9HDC9	APMAP	1,51565734	0,006946698	0,1940073
P24592	IBP6	1,75304476	0,006946698	0,1940073
P11226	MBL2	0,56180181	0,0100578	0,1940073
P05019	IGF1	1,82139955	0,01435389	0,1966483
O43866	CD5L	0,58111656	0,02800782	0,2558047
P20851	C4BPB	0,4994646	0,03281002	0,2724226
P35527	K1C9	0,45485787	0,04455332	0,3130156

5.7. Análisis pathway y de Gene Ontology (comparación DGH (basal) – controles)

Esta herramienta de análisis implementa una aproximación de ‘análisis de impacto’ la cual no sólo toma en cuenta la sobre-representación de genes diferencialmente expresados en una ruta determinada (es decir, el análisis de enriquecimiento) sino que también toma en cuenta información topológica como la dirección y el tipo de señales en una ruta, la posición, función, y tipo de proteína (Tarca et al, 2009). Se analizaron los datos en el contexto de las rutas obtenidas a partir de la base de datos de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Publicación 78.0+/06-02, 16 de junio) (Kanehisa y Goto, 2000) y ontologías genéticas a partir de la base de datos del Gene Ontology Consortium (14 de marzo de 2016) (Ashburner et al, 2000). Para cada término de GO se compara el número de genes diferencialmente expresados con el número de genes que se esperan por pura casualidad, calculando un p-valor empleando la distribución hipergeométrica.

Se implementó un análisis de rutas metabólicas sobre las proteínas diferencialmente abundantes usando el software iPathwayGuide. Un p-valor final se calculó para cada secuencia empleando el método de Fisher y luego se ajustó para las comparaciones múltiples usando el ajuste FDR. Al usar esta aproximación, no se hallaron rutas metabólicas significativamente impactadas por el DGH al compararse con controles sanos (Figura 10). Rutas relacionadas con la interacción del receptor de la matriz extracelular (ECM) (KEGG: 04512), activación plaquetaria (KEGG: 04611) y adhesión focal (KEGG: 04510) mostraron p-valores corregidos por FDR de 0,085, con 8, 7 y 6 proteínas diferencialmente expresadas, respectivamente (Figura10).

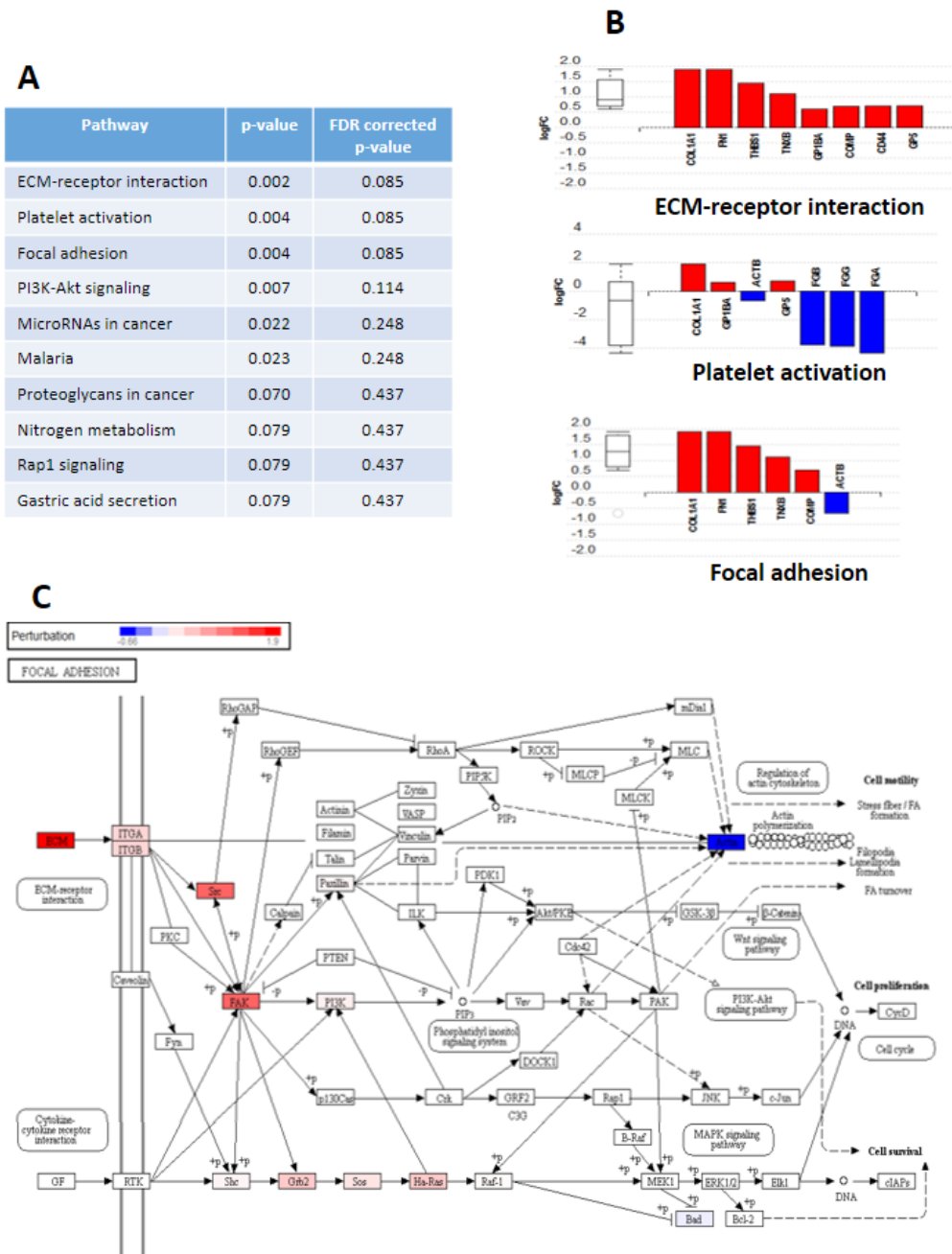


Figura 10. Análisis Pathway. A, Rutas metabólicas afectadas y sus valores p asociados. B, proteínas con abundancia diferencial (DGH vs Control) para los tres pathways con menores p-valores. C, diagrama del pathway de adhesión focal (KEGG:04510).

El software iPathwayGuide se utilizó asimismo para el análisis de Gene Ontology (GO), usando la aproximación de la sobrerrepresentación para computar la significación estadística de observar más de un determinado número de genes diferencialmente expresados, y los p-valores se ajustaron para comparaciones múltiples usando la aproximación de recorte de ponderación. La tabla 15 muestra los resultados para el análisis GO. Las proteínas relacionadas con la activación plaquetaria, la adhesión celular y el grupo de las lipoproteínas de alta densidad, se enriquecieron considerablemente.

Tabla 15. Resultado del análisis de Gene Ontology. Componentes celulares, funciones moleculares y procesos biológicos sobrerrepresentados entre las proteínas con abundancia diferencial entre el grupo DGH y el grupo de control.

Nombre	N° proteínas (AD/todas)	Valor p ajustado
Componentes celulares GO		
Partícula de lipoproteína de alta densidad	10/19	0.017
Funciones moleculares GO		
Adhesión celular unión molecular	10/17	0.009
Actividad transportadora de sustratos específicos	12/21	0.018
Unión de heparina	12/24	0.019
Procesos biológicos GO		
Activación plaquetaria	11/15	2.400e-4
Regulación positiva de la expresión genética	11/20	0.003
Respuesta celular al estímulo citoquímico	12/19	0.004
Adhesión celular	25/53	0.033
Organización de la matriz extracelular	16/31	0.039

AD, abundancia diferencial; GO: Gene Ontology; Significación $p < 0.05$

Al comparar los niveles séricos de colesterol total, HDL-colesterol, y LDL-colesterol y triglicéridos entre los grupos DGH y control, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 16).

Tabla 16. Medición niveles séricos del perfil lipídico en ambos grupos (DGH y Control), y valor p de los test que evalúan diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Grupo DGH Media±SD	Grupo Control Media±SD	Test Shapiro-Wilk p-valor	p-valor*
Colesterol Total (mg/dL)	173.00±26.12	167.80±33.89	0.99	0.6417
HDLc (mg/dL)	54.40±11.76	53.13±12.18	0.22	0.7741
LDLc (mg/dL)	107.00±20.50	102.47±32.50	0.19	0.6519
Triglicéridos (mg/dL)	56.40±23.01	59.33±26.82	0.02	0.7713

Los datos se expresan como media ±SD

* p-valor correspondiente a la prueba t-Student para el colesterol HDLc, LDLc y colesterol total y U de Mann Whitney para los triglicéridos, en función de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Significación $p < 0.05$

5.8. Selección de biomarcadores diferenciadores de los grupos DGH basal y control

Para ello se aplicó la combinación de 3 algoritmos de aprendizaje automático sobre los datos cuantitativos de las 121 proteínas significativas (valor $p < 0.05$). Este análisis de *feature selection* creó un ranking de las proteínas de acuerdo a lo bien que cada una de ellas clasificaba una muestra en el grupo correcto. El resultado del proceso de selección de biomarcadores se visualiza como un gráfico de importancia (Figura 11A), donde la abundancia y la co-ocu-

rrencia de las proteínas seleccionados se visualizan gráficamente como una red. Con el fin de evaluar la robustez del proceso de selección, se repitió 20 veces el análisis y las proteínas biomarcadores candidatas se ordenaron según su frecuencia de selección (Figura 11B y Tabla Suplementaria S7 (disponible en el CD)). La candidata número uno fue FIBA, la cual se seleccionó en un panel de candidatos en más del 35% de las repeticiones del análisis. APOA4 y FHR4, identificadas como la segunda y tercera mejor proteína respectivamente, se seleccionaron en más del 32% de todas las repeticiones de selección. Las siguientes candidatas fueron SAA2, FINC y CXCL7, que aparecieron en el 27%, 23% y 20% de las repeticiones de selección. Todos los demás biomarcadores candidatos alcanzaron una frecuencia de selección inferior al 20%. En la figura 11C se muestran los valores cuantitativos, derivados del análisis SWATH, en los dos grupos (DGH y control) para las 10 proteínas mejor clasificadas en el análisis de *feature selection*.

Finalmente, para obtener un panel de biomarcadores con el menor número posible de proteínas y con el mejor rendimiento de clasificación entre enfermo DGH y sano, se realizó un análisis ROC sobre las diez proteínas mejor clasificadas en el proceso de *feature selection*, y sus combinaciones dos y de tres elementos. El análisis ROC, y el valor del área bajo curva (AUC), nos da una estimación de la eficacia predictiva (la capacidad para diferenciar entre ambos grupos) de la proteína o grupo de proteínas. En la Tabla Suplementaria S8 (disponible en el CD), se muestran los valores AUC para las proteínas principales y las combinaciones para dos y tres proteínas entre las seis primeras, según lo derivado del proceso de *feature selection*. El mejor rendimiento de clasificación se obtuvo para la combinación de ApoA4, FHR4 y CXCL7 (AUC de 1,0, 100% sensibilidad y especificidad).

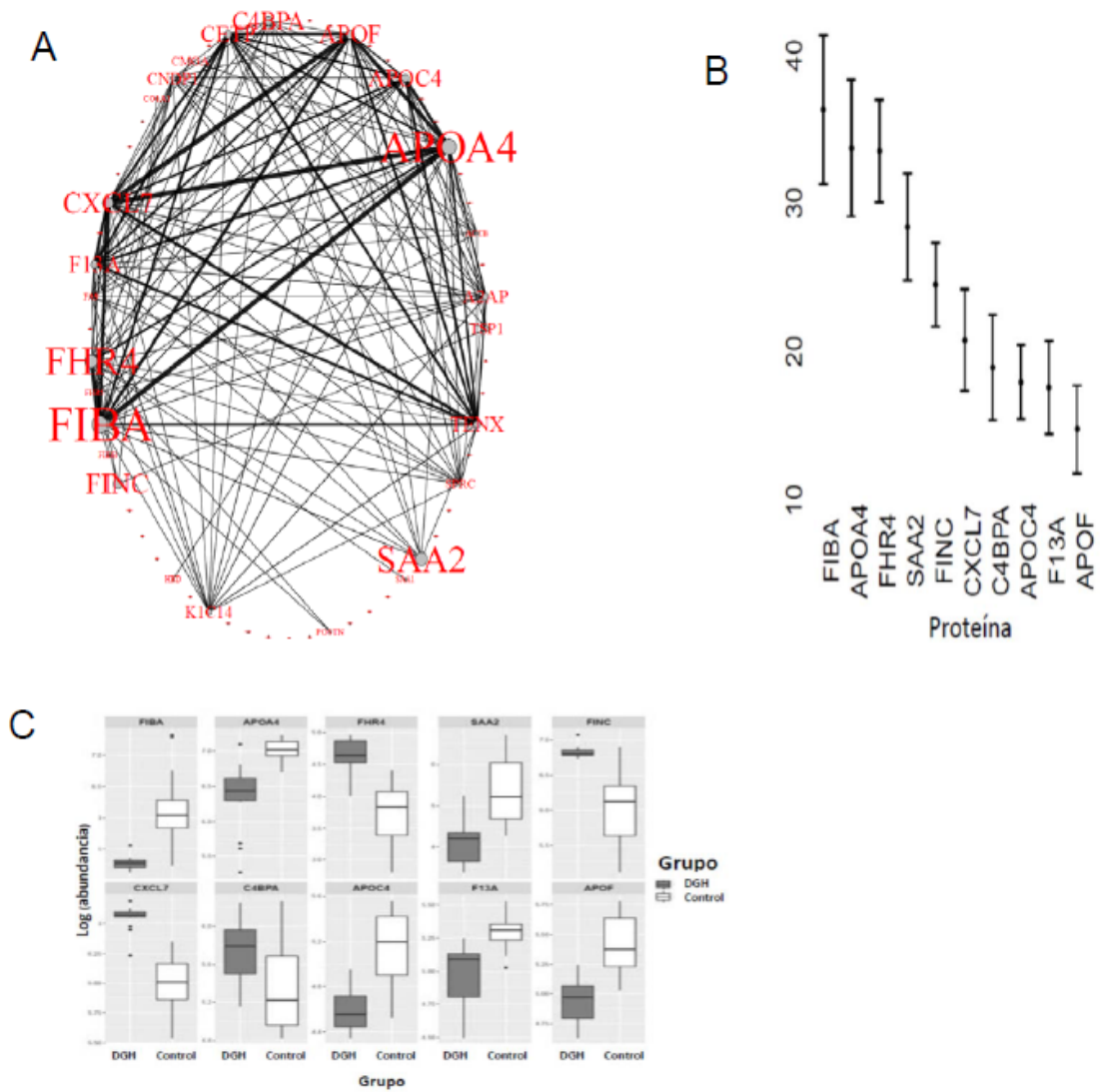


Figura 11. Resumen del resultado de la selección de biomarcadores (feature selection).

(A) Gráfico de importancia: el tamaño de la etiqueta del nodo es proporcional a la frecuencia de selección de la proteína en un panel de candidatos tras un bootstrapping de 100. La anchura de las líneas de unión entre nodos representa la co-ocurrencia en un panel de candidatos de los nodos que une la línea. (B) El proceso de *feature selection* se repitió 20 veces, se representan las diez proteínas con mayor frecuencia de ser clasificadas en el grupo de marcadores. (C) se muestran los valores cuantitativos, derivados del análisis SWATH, en los dos grupos (DGH y control) para las 10 proteínas mejor clasificadas en el análisis de *feature selection*.

6. DISCUSIÓN

6.1. Selección de los pacientes, tamaño de la muestra, valoración clínica y antropométrica, toma de muestras y aspectos metodológicos

La selección de pacientes se realizó sobre niños prepúberes (Tanner 1), de ambos sexos, con diagnóstico o no de DGH y edades similares.

Se efectuó sobre niños prepúberes y no púberes porque durante la pubertad aparecen valores más altos de las hormonas sexuales que determinan una mayor concentración de GH circulante (Murray PG y Clayton PE, 2013).

El patrón de crecimiento humano altera el inicio de la actividad del eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal, llevando a un acrecentamiento en la producción de andrógenos (en los hombres) y estrógenos (en la mujer) cuyo resultado se traduce en un aumento significativo de la secreción de GH y un aumento de la concentración de IGF-I sérico. Por ejemplo, la administración de testosterona a niños prepuberales provoca un aumento tanto de la secreción de GH como de la concentración de IGF-I vía GHRH (Giustina et al, 1997).

El Comité de Ética no permitió la obtención de las muestras sanguíneas en el grupo control, a los seis meses, motivo por el que no se obtuvieron. Estos niños se beneficiaron de un examen de salud especialmente dirigido a su estado nutrición, un examen oftalmológico y una valoración cardiaca, pero no son el objetivo de este estudio. Estos pacientes fueron derivados desde los centros de Salud y todos los padres y/o tutores firmaron el consentimiento informado.

La muestra como ya se ha indicado comprendía 30 pacientes, 15 casos (DGH) y 15 controles. De acuerdo a estudios de proteómica con SWATH en biofluidos, se estima que a partir de tamaños muestrales de 10-12, se obtendría una adecuada potencia estadística (Ortea et al, 2016).

Se realizaron análisis globales. No se incluyen los resultados de los mismos porque exceden al objetivo de la presente tesis. Se obtuvieron los valores de FSH y LH, testosterona y estradiol en niños y niñas respectivamente y en los controles para descartar pubertad junto con las manifestaciones clínicas y el resto de parámetros analíticos para garantizar que eran controles sanos, que no presentaban patologías asociadas.

Se midieron los parámetros de colesterol total, HDLc y LDLc no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos DGH y Control (Tabla 16). Aunque si se ha encontrado mediante el análisis proteómico una disminución en la abundancia de algunas de las apolipo-

proteínas del grupo HDL. Aunque se ha asociado el DGH en el adulto con un aumento de los niveles de LDLc y colesterol total, con niveles más bajos de HDLc, y con una prevalencia variable de hipertrigliceridemia (Johansson et al, 1994; Gazzaruso et al, 2014; Isgaard et al, 2015; Rothermel y Reinehr, 2016), la situación en niños con DGH no es tan evidente. Así, algunos estudios con niños diagnosticados de DGH no tratados no encuentran anomalías en el perfil lipídico (Boot et al, 1997; Lanes et al, 2003; Salerno et al, 2006; Ramistella et al, 2014; Rothermel y Reinehr, 2016), mientras que otros estudios muestran un aumento del colesterol LDL y total en los niños con DGH no tratados, pero no presentando diferencias en cuanto a colesterol-HDL y triglicéridos (Lanes et al, 2001; Lanes et al, 2006; Ciresi et al, 2007; Metwalley et al, 2013; Capalbo et al, 2014; Rothermel y Reinehr, 2016). Por lo tanto, nuestros resultados, donde no hay cambios en el colesterol-HDL, son congruentes con estos estudios previos.

Sin embargo, tras el análisis proteómico hemos encontrado que, en los niños con DGH no tratados, existe una disminución de la abundancia de las apolipoproteínas del grupo HDL. El HDLc es transportado en el interior de partículas de lipoproteínas que son particularmente heterogéneas en tamaño, densidad, y composición lipídica y proteica (Asztalos et al, 2011). Aunque la medición química del colesterol HDLc, que evalúa el colesterol transportado por las partículas de HDL, se está utilizando como marcador clínico de cardioprotección, se está hipotetizando que los índices alternativos de HDL, como el número o el tamaño de las partículas de HDL pueden ser mejores marcadores (Asztalos et al, 2011; Mora et al, 2013; Kontush, 2015). Concretamente, los datos disponibles sugieren que la relación inversa entre el número de partículas de HDL y la enfermedad cardiovascular puede ser un mejor predictor de riesgo cardiovascular que unos valores bajos de colesterol HDL (Kontush, 2015). Por lo tanto, nuestros resultados pueden explicarse por un cambio en el número y tamaño de las partículas de HDLc: partículas de HDLc de mayor tamaño pero en menor número explican la menor abundancia de las proteínas HDL en niños con DGH que en controles sanos, mientras se mantienen al mismo tiempo los niveles de HDLc, pues la proporción entre proteínas HDL y HDLc disminuye con el tamaño de la partícula de HDL (equivaldría al ratio área de la superficie de una esfera con respecto al volumen de la esfera). Es importante destacar que, al contrario de lo que se observa en adultos con DGH, los pacientes con DGH incluidos en nuestro estudio son todos negativos en cuanto a la alteración del metabolismo lipídico, medido utilizando el procedimiento analítico común en clínica (medición química del HDLc, LDLc, colesterol total y triglicéridos) (Tabla 16). La menor abundancia de las apolipoproteínas del HDL que encontramos en niños con DGH podría poner de manifiesto el comienzo de esta alteración del metabolismo lipídico. En este sentido, la medición de las apolipoproteínas del grupo HDL en niños puede servir no solo como biomarcador de DGH, sino también para anticipar el descenso de los niveles de HDLc que se ha encontrado en adultos DGH y que se asocia con mayor riesgo cardiovascular.

Las muestras del grupo con DGH a los 6 meses de tratamiento se consiguieron en este periodo \pm 3 días. No se perdió el seguimiento y/o recogida de las muestras de ningún participante. Para ello, se requirió una coordinación por parte del equipo investigador para la programación de las visitas.

6.2. Análisis proteómico

La técnica de *SWATH Acquisition* permite explorar conjuntos de datos multiplexados MS/MS a un nivel que no era posible con los enfoques tradicionales.

La técnica genera datos muy específicos de fragmentos de iones de todos los precursores en el rango de masas estudiado. A diferencia de los enfoques tradicionales de adquisición, este método no se basa en la detección de masas de iones precursores para activar la adquisición MS/MS. En su lugar, se fragmentan sistemáticamente todos los componentes de la muestra a través de ventanas de selección. En esta línea, proporciona una mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, así como un mayor rango dinámico en la cuantificación de proteínas (Shi et al, 2016; Gillet et al, 2012), por lo que hace que el método SWATH-MS sea una estrategia prometedora para el descubrimiento de biomarcadores (Craft et al, 2013; Liu et al, 2013; Holwinski et al, 2016; Anjo et al, 2017).

6.3. Identificación de las proteínas y análisis pathway DGH basal versus controles sanos

Rutas relacionadas con la interacción del receptor de la matriz extracelular (ECM) (KEGG: 04512), activación plaquetaria (KEGG: 04611) y adhesión focal (KEGG: 04510) mostraron p-valores corregidos por FDR de 0,085, con 8, 7 y 6 proteínas diferencialmente expresadas, respectivamente. Las adhesiones focales son estructuras especializadas en los puntos de contacto de la célula con la matriz celular que participan en el enlace estructural entre los receptores de membrana y el citoesqueleto de actina, mientras que algunos de sus componentes son moléculas señalizadores. Los eventos señalizadores que dichas adhesiones focales inician, culminan en la reorganización del citoesqueleto de actina, necesario para los cambios en la forma y la motilidad de la célula, y en la expresión génica. Alteraciones morfológicas y modulaciones de la expresión génica similares se inician a través de la unión de factores de crecimiento a sus receptores respectivos, lo cual enfatiza la comunicación cruzada entre las señalizaciones mediadas por adhesión y por factores de crecimiento. Estos grupos de proteínas están relacionados con la motilidad y proliferación celular, el transporte entre células y el desarrollo tisular, todo ello apuntando a un vínculo entre los cambios proteómicos producidos por DGH y la estructura y morfogénesis de los tejidos y órganos.

Como se ha expuesto anteriormente, el metabolismo de los lípidos se ve asimismo afectado considerablemente por el DGH. Nuestros resultados muestran que varias lipoproteínas (ApoA4, ApoB, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoC4, ApoD, ApoE y ApoF, y Apo H) estaban infrarreguladas en el DGH, con *fold changes* (entre los grupos DGH y control) en un rango entre 0,24 al 0,88 (Tablas 11 y S3). Otras proteínas como: HDL (SAA1, SAA2 y SAA4; amiloide sérico A-1, A-2 y A4 respectivamente) estaban también infrarreguladas en el DGH, con *fold changes* tan bajos como 0,028 para SAA1 y SAA2 (35 veces menos abundante en DGH que en los controles).

Las alteraciones lipídicas que acompañan al DGH (Feingold et al, 2017) pueden conducir a una acentuación de la adiposidad (Feingold et al, 2017; Ciresi et al, 2007), lo cual puede contribuir a que se produzcan dislipidemias (Feingold et al, 2017).

6.3.1. Selección de biomarcadores

En el estudio de biomarcadores y con el fin de evaluar la robustez del proceso de selección, se repitió este análisis 20 veces y las proteínas biomarcadores candidatas se ordenaron según su frecuencia de selección (Figura 11B y Tabla S7). El candidato número uno fue FIBA encontrándose en más del 35% de las pruebas de selección en un grupo de rasgos. APOA4 y FHR4, identificadas como la segunda y tercera mejor proteína respectivamente, se seleccionaron en más del 32% de todas las pruebas de selección. Las siguientes candidatas fueron SAA2, FINC y CXCL7, que aparecieron en el 27%, 23% y 20% de las pruebas de selección. Todos los demás biomarcadores candidatos alcanzaron una frecuencia de selección inferior al 20%.

Asimismo, la precisión predictiva (la capacidad para diferenciar entre ambos grupos) de las proteínas de alto rango y sus combinaciones, se evaluó con un análisis ROC. En la Tabla S8 (disponible en el CD), se muestran los valores AUC para cada una de las 10 proteínas principales y las combinaciones para dos y tres proteínas entre las seis primeras, según lo derivado del proceso de selección de rasgos. El mejor rendimiento de clasificación se obtuvo para la combinación de ApoA4, FHR4 y CXCL7 (AUC de 1,0, 100% sensibilidad y 100% especificidad). Esto sugiere que la combinación de estas tres proteínas puede ser un panel de potenciales marcadores biológicos del DGH idiopático en el niño prepuberal, pudiéndose aplicar para contribuir de forma más exacta a su posible diagnóstico.

6.3.2. Significado biológico de las proteínas que tras aplicar los algoritmos separan con 100% de sensibilidad y especificidad

APO A-IV (apolipoprotein A-IV). Apolipoproteína A-IV.

La Apolipoproteína A-IV (APO A-IV) es una glicoproteína sintetizada por el intestino humano. En los roedores, tanto el intestino delgado como el hígado la secretan, siendo el primero el principal órgano responsable de la circulación de la apoA-IV. La síntesis intestinal se estimula marcadamente por la absorción de grasa. Así mismo, la formación local de quilomicrones actúa como una señal para la inducción de su síntesis intestinal, acentuándose, a su vez, por un factor del íleon, probablemente el péptido tirosina tirosina (PYY).

Tras ser sintetizada por el intestino delgado, posteriormente se une a los quilomicrones a través de los enterocitos para ser secretada hacia el interior del tronco linfático intestinal durante la absorción de grasas (Tso et al, 2004). El aumento de ésta podría contribuir a los efectos beneficiosos de la GH en el tratamiento del intestino corto (Byrne et al, 1995a, b; Seguy et al, 2014). La GH no se utiliza de forma rutinaria en Europa, aunque está autorizada por FDA desde

2004 para el Síndrome del Intestino Corto (Williamson, 1978; Seguy et al, 2014; Castro-Feijóo et al, 2015).

En la actualidad, se conoce que el hipotálamo, sobre todo el núcleo arqueado, es otra zona activa de la expresión de la apoA-IV (Liu et al, 2001; Tso et al, 2004).

Existe evidencia de que la apo A-IV del hipotálamo está regulada fisiológicamente, no sólo por estados de ayuno y comida rica en grasas, sino también por el ritmo diurno. Así, por ejemplo, los niveles de esta se incrementan durante la fase de luz y decrecen gradualmente durante la fase de oscuridad.

Se ha visto que la leptina, proteína producida por el tejido adiposo, pudiera emitir una señal al hipotálamo en función de la cantidad de grasa que hay en el cuerpo. Cuando los niveles de grasa son altos, esta disminuye la ingesta de alimentos y aumenta el metabolismo energético (Woods et al, 1998). Morton et al (1998), evidenciaron una infrarregulación de los niveles de apo A-IV mRNA intestinales a través de la leptina. Esta observación fue confirmada *in vivo* por Doi et al (2001). Se ha demostrado en roedores y humanos, que la síntesis y secreción intestinal de esta, están sobrerregulada por la insulina (Attia et al, 1997; Black et al, 1992).

La apo A-IV circula asociada a la HDLc y a los restos de quilomicrones, aunque una gran porción de esta se presenta libre. Desempeña un papel fundamental en el metabolismo y transporte de lípidos dietarios, así como en la regulación de la ingesta de comida (Roman-Padilla et al, 2016).

Por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y debido a que interviene en el transporte reverso del colesterol, se han relacionado las funciones propuestas de la apoA-IV circulatoria con la prevención de la enfermedad cardiovascular (Wang et al, 2015). En una cohorte de pacientes, Dekker et al. demostraron como el cociente de LDLc/HDLc disminuyó durante los dos años de tratamiento únicamente en el grupo con DGH y manteniéndose sin cambios en el grupo de baja talla idiopática (TBI) (Dekker et al, 2013).

Muchas de estas funciones no son exclusivas de la apo A-IV, siendo comunes a otras apolipoproteínas (Wang et al, 2012).

CXCL7 (Platelet basic protein). Proteína básica de las plaquetas.

La CXCL7, también llamada NAP-2 (Proteína Activadora de Neutrófilos tipo 2) interactúa con su ligando, el receptor para la quimiocina CXCR2 en las células madre mesenquimales (MSC) (Almeida et al, 2016). Esta se caracteriza por sufrir proteólisis postraduccional del extremo amino terminal de la molécula precursora básica de las plaquetas (PPBP) dando lugar a distintas variantes. La función principal es la activación de los neutrófilos (Piccardoni et al, 1996; Ehlert et al, 1995; Ehlert et al, 1998; Krijgsveld et al, 2000).

El descubrimiento de las células madre/progenitoras en la glándula pituitaria se inició hace una década con la identificación de una subpoblación de células llamadas “*Side Population*” (SP) en la glándula de roedores y pollos adultos (Chen et al, 2005).

Esta subpoblación de células tiene la capacidad de evacuar “*efflux capacity*”, característico de las células madre y que permite que se defiendan contra sustancias tóxicas. A su vez, se ha establecido la existencia de las células madre en la pituitaria (Chen et al, 2009; Fauquier et al, 2008; Garcia-Lavandeira et al, 2009).

El receptor quimiotactico CXCR4 (receptor de quimiocinas CXC tipo 4), que cada vez más se clasifica como un marcador general de pluripotencialidad, se encuentra también suprarregulado en el compartimento de las células madre de la pituitaria (Vankelecom, 2012)

Podría decirse que las células madre pituitaria desempeñan un papel en la glándula desconocido en cuanto a las funciones y patología, pudiendo tener este papel relevancia de interés clínico (Vankelecom, 2014).

Goto et al (2016) identificaron a las células CXCR4, CD45, como una población celular importante para la osteoclastogénesis. Asimismo, se identificó que las células precursoras de los osteoclastos y las células CXCR4, CD45, interactúan a través de las vías de señalización de quimiocinas que involucran al factor 1 derivado de las células estromales, el ligando 7 (CXCL7) de quimiocina (motivo C-X-C) y el ligando 1 (CX3CL1) de quimiocina (motivo C-X3-C). La regulación de la función de las células CXCR4, CD45, podía contribuir a la terapia en las enfermedades que conllevan la pérdida en la homeostasis del hueso.

Reciente estudios han mostrado que la señalización de CXCL7/CXCR2 juega un importante papel en distintas neoplasias, incluyendo, pulmón, riñón, colon y cáncer de mama (Guo et al, 2017).

Los datos publicados no muestran un aumento del riesgo de neoplasia primaria, leucemia, tumores extracraneal o intracraneal recurrente en pacientes sin factores de riesgo. Sin embargo, el riesgo de neoplasia secundaria se incrementa, principalmente en aquellos pacientes que han recibido tratamiento con radiación como tratamiento de tumor en el sistema nervioso central (Stochholm y Kiess, 2018).

FHR4 (Complement factor H-related protein 4). Proteína 4 relacionada con el factor H del complemento.

Participa en la regulación del complemento y puede asociarse con lipoproteínas y puede desempeñar un papel en el metabolismo de los lípidos (Skerka et al, 1997)

La hormona del crecimiento GH es necesaria para la correcta maduración y funcionamiento del sistema inmunitario. Los ratones deficientes de GH y en tirotrófina, manifiestan deficiencia de la inmunidad mediada por células, defecto que es corregido parcialmente por la administración de GH, y totalmente cuando se añade a este tratamiento la tiroxina, de lo que se

deduce que la GH entre otras hormonas, ejerce efectos positivos sobre el sistema inmune (Besedovsky y Sorkin, 1977; Dorshkind et al, 2003).

Al asociarse con las lipoproteínas, podría contribuir con aspectos beneficiosos sobre el metabolismo de los lípidos que se obtiene tras el tratamiento con GH en los niños y adultos deficitarios.

6.4. Identificación de proteínas con abundancia diferencial tras tratamiento DGH 6 meses versus DGH basal

Se evaluaron los sueros de los niños con DGH a los seis meses de tratamiento. Tal vez podría ser criticado el escaso tiempo de tratamiento para observar modificaciones en el espectro proteico. La Unidad de Endocrinología Pediátrica del HURS de Córdoba, viene realizando una línea de investigación respecto del tratamiento a corto plazo con GH, basado en el conocimiento que la mayor respuesta respecto de la velocidad de crecimiento se produce a los seis meses de la terapia con GH. (Cañete et al, 2012; Gimenez-Gómez et al, 2016)

Cuando se comparan las muestras (sueros) de los niños con DGH t6 meses vs DGH t0 basal se obtienen 39 proteínas con diferencias estadísticamente significativas (Tabla. 12). Se ha podido observar que el metabolismo de las lipoproteínas se ve afectado (APOC4, APOD, APOC1, APOF, APOE, APOA4, APOH) apareciendo sobre-reguladas con un rango de *fold-change* entre DGH t6/DGH basal t0 del 1,23 al 3,47 e infra-regulada la APOL1 con un *fold-change* entre DGH t6/DGH basal t0 del 0,82. También proteínas como la proteína similar al antígeno CD5 (CD5L) y la proteína 4 relacionada con el factor del complemento 4 (FHR4) ambas infrarreguladas con un *fold-change* de 0,58 y 0,57 respectivamente. También se ve afectado algunas proteínas relacionadas con la coagulación y la homeostasis, como: algunos factores de la coagulación (FA9, FA5, FIBA) que aparecen sobre-regulados con un rango de *fold-change* entre 1,28- 1,57 y otros como el FA7, FBLN1, C4BPA, PTPRJ infra-regulados con un *fold-change* de 0,62, 0,72, 0,49 y 0,71 respectivamente; Otras están relacionadas con la mineralización y formación del hueso (FETUA, ECM1). También aparecen sobre regulados la IGF-I y la IGFBP6, con un *fold-Change* de 1,82 y 1,75 respectivamente.

6.4.1. Significado biológico de las proteínas

Como ya sea comentado anteriormente, el tratamiento con GH tiene un efecto beneficioso sobre la composición corporal y el perfil lipídico. Varios estudios mostraron que en niños pre-puberales con DGH presentaban una alteración del metabolismo lipídico, con elevación de los triglicéridos, colesterol total y niveles de colesterol LDL, junto con niveles bajos de colesterol HDL comparado con controles sanos. El tratamiento de estos pacientes con GH ha demostrado que induce cambios favorables en el perfil lipídico, con una reducción de todos los valores (Andersson et al, 2009; Metwalley et al, 2013; Capalbo et al, 2014; De Marco et al, 2014; Rothermel

y Reinehr, 2016; Cañete Estrada et al, 2017a, b; Chen et al, 2018). Estos mismos resultados se han confirmado en adolescentes y adultos con DGH (Lanes et al, 2003).

Así, por ejemplo, Decker et al (2013), demostraron en su estudio que las diferentes apolipoproteínas (isoformas monoméricas y diméricas de Apo A-II, Apo C-1 y SAA-4) se asocian a cambios en la composición corporal en respuesta al tratamiento con la GH en niños prepuberales y talla baja, con o sin DGH. Tras tratamiento con GH se revierte la distribución de la grasa y se asemeja a los niños normales no deficitarios (Capalbo et al, 2017). La apo C-1 tiene efectos beneficiosos sobre el riesgo cardiovascular, al participar en el transporte del colesterol, en la regulación negativa de la síntesis de ácidos grasos, actividad de la lipoproteína lipasa y regulación positiva sobre la esterificación del colesterol.

La GH activa la expresión del receptor de la LDL, lo que conduce a la disminución del LDLc. La Apo E es un apolipoproteína que se une a la VLDL y es secretada por el hígado. La VLDL es hidrolizada por lipoproteína lipasa, que lo convierte en restos de VLDL, metabolitos ricos en apoE de VLDL. ApoE en partículas de lipoproteínas funciona como un ligando del receptor de lipoproteínas, promoviendo su eliminación de la circulación. Existen distintas isoformas de esta apolipoproteína que tienen diferente afinidad al receptor de la LDL y distintas tasas de conversión de VLDL a LDL (Nagasaka et al, 2015).

Los portadores de apolipoproteína (apo) E4 tienen mayor afinidad por el receptor de LDL, inhibiendo su expresión y produciendo mayores concentraciones de LDLc. Nagasaka et al (2015), vieron que los niños con DGH portadores de Apo E4 tienen mayor concentración de LDLc y también experimentan una mayor reducción de este tras el tratamiento con GH, comparado con aquellos con DGH no portadores de Apo E4.

Se han descrito alteraciones en la función de la Apolipoprotein 1 (Apo L-1) debido a factores genéticos, ambientales o relacionados con estilos de vida que se han asociado con la aterosclerosis, alteraciones en el metabolismo de los lípidos, obesidad, esquizofrenia, cáncer y enfermedad renal crónica (Hu et al, 2012)

La Apo L1 se encuentra principalmente asociada a las partículas HDL (un 10% unida a las proteínas conteniendo Apo A-1). Los niveles de esta apolipoproteína se correlacionan con la concentración de triglicéridos en plasma tanto en sujetos dislipémicos como aquellos con valores normales (Duchateau et al, 2000). Esto es debido a que la Apo L-1 se encuentra en las partículas de HDL, asociada a los triglicéridos (Albert et al, 2005). Varias líneas de investigación señalan su posible asociación con hiperlipidemia, obesidad y aterosclerosis (Duchateau et al, 2000; Albert et al, 2005; Li et al, 2009). También se ha encontrado un papel protector en la respuesta inmune innata y en el riñón (Hu et al, 2012; Freedman y Skorecki, 2014).

La GH está asociada con un aumento en la lipólisis en el tejido adiposo y gluconeogénesis y glicogenólisis en el hígado produciendo una reducción del consumo de glucosa en el músculo ante un estado de resistencia a la insulina (Bergan et al, 2015; Olarescu y Bollerslev, 2016; Bergan-Roller y Sheridan, 2018). En estado de déficit de GH se incrementan los depósitos de grasa y se altera el perfil lipídico. El tratamiento con GH reduce la grasa y restablece los parámetros

lipídicos hasta valores normales tanto en adultos como en niños con DGH (Chaves et al, 2013; Binay et al, 2015).

Otro grupo de proteínas que se ve alterada en nuestro estudio están relacionadas con la coagulación. Existen muchos datos que señalan que el DGH lleva a un estado de hipercoagulabilidad motivado por la hipofibrinólisis (Kyriakakis et al, 2016). El tratamiento con GH parece revertir estas anomalías en la coagulación. En un estudio llevado a cabo en niños prepúberales con DGH se vio que estos tenían valores más altos de PAI-1 y Fibrinógeno comparado con los controles sanos. Tras el tratamiento con GH durante 6 meses se disminuyó el PAI-1 aunque el fibrinógeno y el factor de Vw no (Cañete et al, 2012).

También, la IGF-I y la IGFBP6 aparecen sobrerregulados tras el tratamiento con GH. La GH, IGFBP-3 y la IGF-1 son biomarcadores de diagnóstico y tratamiento en niños con DGH (Schilbach et al, 2018). La GH incrementa los niveles séricos de IGF-1 mediante la estimulación de la producción hepática (Okajima et al, 2008). Esto justificaría el aumento de la abundancia de ésta tras el tratamiento con GH en nuestro estudio.

6.5. Proteínas que no estando alteradas en DGH basal, tras el tratamiento se modifican

9 proteínas que no estando alteradas en DGH periodo basal, tras el tratamiento se modifican: K1C9, IGF1, PSG1, MBL2, APMAP, IBP6, CD5L, C4BPB, TRY1.

6.5.1. Significado biológico de las 9 proteínas que no estando alteradas en el DGH periodo basal, tras el tratamiento se modifican.

6.5.1.1. K1C9 (Keratin type I cytoskeletal 9). Queratina tipo I citoesqueleto 9.

Puede tener un papel tanto en la maduración del tejido epitelial palmar y plantar como en el mecanismo que participa en la formación de los mismos. Participa en el ensamblaje de los filamentos de queratina (Langbein et al, 1993; Kobayashi S, Kore et al, 1999).

Se conoce que los niños con DGH presentan manos y pies pequeños (micromicria), uñas poco desarrolladas. El cabello es escaso y fino (Pombo y Castro-Feijóo, 2005; Cañete y Gil Campos, 2009; Cañete et al, 2015).

El tratamiento local con GH recombinante mejora la producción de IGF-1 y favorece la migración de queratinocitos y la proliferación de fibroblastos (Lee et al, 2010; Dioufa et al, 2010). Esto podría justificar el aumento de la abundancia de K1C9 para cumplir su función epitelizante y ensambladora al aumentar el sustrato de dicha proteína. Esta aproximación debe de ser tomada con cautela pues las queratinas son un contaminante natural en proteómica.

6.5.1.2. IGF-1 (Insulin-like growth factor 1). Factor de crecimiento insulínico tipo 1

Los factores de crecimiento similares a la insulina están relacionados estructural y funcionalmente con la insulina, aunque con una mayor actividad promotora del crecimiento. Tienen un papel como regulador fisiológico del transporte de 2-desoxi-D-glucosa (o en su forma abreviada 2-DG), así como de la síntesis de glucógeno en los osteoblastos, promoviendo el transporte de glucosa en las células osteoblásticas del hueso. Puede desempeñar un papel en la maduración de la sinapsis (Zoidis et al, 2011; Shcheglovitov et al, 2013).

Actúa como ligando uniéndose a la subunidad alfa de su receptor (IGF1R), produciendo la activación de la actividad tirosina quinasa intrínseca que autofosforila los residuos de tirosina en la subunidad beta iniciando así una cascada de eventos de señalización que conducen a la activación de las vías PI3K-AKT / PKB y Ras-MAPK. Se une a las integrinas ITGAV: ITGB3 e ITGA6: ITGB4, permitiendo la formación de complejos ternarios esenciales para la señalización de IGF-1. De esta forma induce la fosforilación y activación de IGFR1, MAPK3 / ERK1, MAPK1 / ERK2 y AKT1 (Saegusa et al, 2009; Fujita et al, 2012; Fujita et al, 2013a, b).

Es conocido que GH aumenta los niveles séricos de IGF-1 mediante la estimulación de la producción hepática (Okajima et al, 2008). Esto justificaría el aumento de la abundancia de esta tras el tratamiento con GH. En un estudio sobre niños obesos con DGH relativo se vio que tras el tratamiento con GH los niveles de IGF-1 aumentaban y de forma significativa con respecto a la concentración de IGF-1 basal antes de iniciar el tratamiento (Liang et al, 2018).

6.5.1.3. APMAP (Adipocyte plasma membrane-associated protein). Proteína asociada con la membrana plasmática en adipocitos.

Puede tener un papel en la diferenciación de los adipocitos (Ilhan et al, 2008). Tras realizar una revisión bibliográfica no se ha encontrado una relación con la función de la GH.

6.5.1.4. IGFBP6 (Insulin-like growth factor-binding protein 6). Proteína 6 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina.

Las proteínas de unión a los factores de crecimiento similares a la insulina prolongan la vida media de los IGFs en el plasma sanguíneo alterando su interacción con los receptores de la superficie celular. Se ha demostrado que estos estimulan o inhiben el crecimiento promoviendo los efectos de los IGFs.

Una propiedad distintiva de la IGFBP-6 es su mayor afinidad por la IGF-2 que por la IGF-1. Van Doorn et al (1999), encontraron que la concentración de GH no parece influir los valores de IGFBP-6 al encontrar que estos eran normales tanto en pacientes no tratados con acromegalia como con DGH. La concentración de IGFBP-6 no varió tras el tratamiento.

Al aumentar los niveles de IGFs, justificaría también una mayor presencia de esta proteína para ejercer su función.

6.5.1.5. CD5L (CD5 antigen-like). Antígeno similar de la proteína CD5.

Actúa como un regulador clave en la síntesis de lípidos: expresado principalmente por los macrófagos en el tejido linfóide e inflamado, regula mecanismos en la respuesta inflamatoria, como la infección o aterosclerosis. Capaz de inhibir el tamaño de las gotas lipídicas en los adipocitos. Tras la incorporación a adipocitos maduros a través de endocitosis mediada por la vía CD36, se asocia con FASN citosólica, inhibiendo la actividad del ácido graso sintasa y llevando a lipólisis, degradación de triacilglicérols en glicerol y ácidos grasos libres (AGL). La lipólisis inducida por la CD5L ocurre con la progresión de la obesidad: participa en la inflamación asociada a la obesidad tras el reclutamiento de macrófagos inflamatorios en tejidos adiposos, una causa de resistencia a la insulina y enfermedad metabólica relacionada con la obesidad. La regulación de lípidos intracelulares mediada por CD5L tiene un efecto directo sobre la regulación de la transcripción mediada por receptores nucleares ROR-gamma (RORC).

Actúa como un regulador clave del cambio metabólico en linfocitos Th17 (o linfocitos T helper 17). Regula la expresión de los genes pro-inflamatorios en los linfocitos Th17 alterando el contenido lipídico y limitando la síntesis del ligando de colesterol de RORC, el factor principal de transcripción de la diferenciación de los linfocitos Th17. CD5L está presente principalmente en los linfocitos Th17 no patogénicos, donde disminuye el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), afectando a 2 proteínas, la MSMO1 y la CYP51A1, que sintetizan ligandos de RORC, limitando la actividad de RORC y la expresión de genes pro-inflamatorios.

Participa en la autoinmunidad asociada a la obesidad a través de su asociación con IgM, que interfiere con la unión de IgM al receptor Fc α / μ y mejora el desarrollo de células plasmáticas longevas que producen autoanticuerpos IgG de alta afinidad (por similitud). También actúa como inhibidor de la apoptosis en los macrófagos: promoviendo su supervivencia al protegerlos de los efectos apoptóticos de los lípidos oxidados durante la aterogénesis (Amézaga N et al, 2014).

Participa en la respuesta temprana a la infección microbiana contra diversos patógenos al actuar como un receptor de reconocimiento de patrones y al promover la autofagia (Sarrias et al, 2005; Sanjurjo et al, 2013; Martínez et al, 2014; Sanjurjo et al, 2015).

Conocemos que la GH produce movilización de los ácidos grasos desde sus lugares de almacenamiento, y aumenta los niveles circulantes de los mismos y su utilización (lipólisis) con el fin de obtener energía. La lipólisis consiste en la transformación de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol y se produce por estímulo de la lipasa en las células del tejido adiposo. Además, estimula la β -oxidación de los ácidos grasos (Bergan et al, 2015). Esto justificaría un aumento en la abundancia de la proteína CD5L tras la administración exógena de GH.

6.5.1.6. C4BPB (C4b-binding protein beta chain). Proteína de unión a la fracción C4b del complemento

Regula la vía clásica de activación del complemento. Se une como cofactor al factor I del complemento que a continuación hidroliza el complemento C4b que acelera la degradación del complejo C4BC2a (convertasa C3) por medio de la disociación de C2a. También interacciona con la proteína S de la coagulación y con el componente amiloide P del suero. La cadena beta del complemento C4 se une a la proteína S. La deficiencia de proteína S se asocia con el riesgo de trombos.

El DGH favorece un estado protrombótico, con una reducción de la actividad fibrinolítica, pudiendo contribuir con un agravamiento del riesgo de eventos aterotrombóticos. El tratamiento con GH en niños con DGH tiene efectos positivos sobre la coagulación y la fibrinólisis (Cañete et al, 2014b; Lanes, 2016). Esto podría explicar el aumento de la proteína de unión C4b, pues la administración de GH tiene efectos sobre la coagulación.

6.5.1.7. MBL 2 (Mannose-binding protein C).Lecitina de unión a la manosa C

La lecitina dependiente de calcio contribuye con la inmunidad innata. Es capaz de unirse a diferentes estructuras de azúcares (manosa, fucosa y N-acetilglucosamina) presentes en diferentes microorganismos promoviendo su eliminación mediante la activación de la vía del complemento. Se une a las células necróticas y apoptóticas tardías, pero no a las células apoptóticas tempranas, facilitando su eliminación por los macrófagos. También se puede unir ADN (Nauta et al, 2003).

Varios estudios *in vitro* han mostrado que la GH humana tiene un efecto modulador sobre la secreción de citoquinas. Donde se demostraron que la GH puede potenciarla producción de interferón- γ (IFN- γ) por medio de células periféricas de los islotes sanguíneos (PBMC) de individuos sanos con diferentes concentraciones de GH (Uronen-Hansson et al, 2003). Asimismo, la GH potencia la producción de IL-1 α , TNF- α y IL-6 (Uronen-Hansson et al, 2003). A su vez, la producción monocítica de IL-6 y TNF- α aumenta en pacientes con déficit completo de la hormona del crecimiento llegando a normalizarse después de la terapia de reemplazo con la GH (Serri et al, 1999; Szalecki et al, 2018).

Szynaka et al (2010), realizaron un estudio con 30 pacientes (niños y adolescentes) con edades comprendidas entre 4.2-18 años con DGH donde vieron que el tratamiento con GH puede tener una influencia positiva en la actividad fagocítica de los macrófagos, especialmente granulocitos, la cual parece ser menor en niños con DGH versus controles sanos. El tratamiento con la GH en niños con DGH no afecta significativamente la actividad del sistema inmunológico expresado por la actividad fagocítica de los monocitos, el porcentaje de linfocitos B, T y NK, y la concentración IgG en el suero sanguíneo.

En 2005 Pagani S et al, realizaron un estudio para establecer si el tratamiento con GH in vivo afecta la producción de citoquinas proinflamatorias por células periféricas en niños con DGH. Se evaluaron 11 niños prepuberales (6 niños y 5 niñas) con DGH, con edades entre 6 y 14 años que fueron emparejados por edad y sexo con 9 controles sanos. Tras 3 meses en terapia con GH, la producción de citoquina TNF alfa incrementó significativamente ($p < 0.05$ by the Wilcoxon test) aunque por debajo con respecto a los controles sanos. Nuestros resultados muestran que la producción de IFN- γ se redujo significativamente en pacientes con DGH frente a los controles sanos. Esto lleva a los autores a pensar que el tratamiento con GH podría causar alteraciones en la respuesta inmunológica inducida por la citoquina proinflamatoria en humanos, y que el tratamiento con la GH podría mejorar esta importante función inmunológica.

6.5.1.8. TRY1 (Trypsin-1). Tripsina 1.

Tiene actividad contra los sustratos sintéticos Boc-Phe-Ser-Arg-Mec, Boc-Leu-Thr-Arg-Mec, Boc-Gln-Ala-Arg-Mec y Boc-Val-Pro-Arg-Mec. La forma de cadena única es más activa que la forma de dos cadenas contra todos estos sustratos (Koshikawa et al, 1994). Al igual que las queratinas, la tripsina es un contaminante habitual en proteómica. En nuestro experimento, en el proceso de digestión de las proteínas hemos utilizado la tripsina.

6.5.1.9. PSG1 (Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 1). Beta-1-glicoproteína específica del embarazo.

Tras la revisión de la bibliografía parece que es un hallazgo sin aparente relación con la GH.

7. CONCLUSIONES

1. Se encuentran 121 proteínas diferenciales en niños con DGH vs controles. La combinación de tres proteínas, la apolipoproteína A-IV (APOA4), la proteína 4 asociadas al factor H del complemento (FHR4) y la proteína básica plaquetaria (CXCL7), mostró la mejor sensibilidad y especificidad para clasificar los individuos en sanos y enfermos.
2. Las rutas metabólicas y los grupos de proteínas más afectados estaban relacionados con la proliferación y motilidad celular, transporte entre células y desarrollo tisular.
3. El grupo de las apolipoproteínas de alta densidad forma un panel biomarcador prometededor en el diagnóstico del DGH, así como en la evaluación del tratamiento.
4. Con el tratamiento a corto plazo con GH en el niño prepúber hay un cambio en 39 proteínas. En 29 de éstas, el tratamiento revierte el efecto de la enfermedad: 8 pertenecientes al metabolismo de las lipoproteínas, 7 relacionadas con la coagulación y homeostasis y 4 con la mineralización y formación de hueso.
5. Para el diagnóstico del DGH en el niño prepúber, la espectrometría de masas ofrece un futuro prometedor. Se abre una novedosa línea de investigación para el estudio del diagnóstico del DGH, la respuesta al tratamiento con GH, y los efectos sobre el metabolismo proteicorelacionados.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aardema MJ, MacGregor JT. Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies. *Mutat Res.* 2002; 499: 13–25
- Abdu TA, Elhadd TA, Akber M, Hartland A, Neary R, Clayton RN. Plasma homocysteine is not a major risk factor for vascular disease in growth hormone deficient adults. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001; 55: 635-638
- Acerini CL, Wac K, Bang P, Lehwalder D. Optimizing Patient Management and Adherence for Children Receiving Growth Hormone. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017; 8: 313. eCollection 2017
- Ahmad T, Garcia-Filion P, Borchert M, Kaufman F, Burkett L, Geffner M. Endocrinological and auxological abnormalities in young children with optic nerve hypoplasia: a prospective study. *J Pediatr.* 2006; 148: 78-84
- Ahmid M, Fisher V, Graveling AJ, McGeoch S, McNeil E, Roach J et al. An audit of the management of childhood-onset growth hormone deficiency during young adulthood in Scotland. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2016a; 2016: 6
- Ahmid M, Perry CG, Ahmed SF, Shaikh MG. Growth hormone deficiency during young adulthood and the benefits of growth hormone replacement. *Endocr Connect.* 2016b; 5: R1-R11
- Aimaretti G, Attanasio R, Cannavò S, Nicoletti MC, Castello R, Di Somma C et al. Growth hormone treatment of adolescents with growth hormone deficiency (GHD) during the transition period: results of a survey among adult and paediatric endocrinologists from Italy. Endorsed by SIEDP/ISPED, AME, SIE, SIMA. *J Endocrinol Invest.* 2015; 38: 377-382.
- Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency-an update. *Nat Rev Endocrinol.* 2010; 6: 562-576
- Albert TS, Duchateau PN, Deeb SS, Pullinger CR, Cho MH, Heilbron DC et al. Apolipoprotein L-I is positively associated with hyperglycemia and plasma triglycerides in CAD patients with low HDL. *J Lipid Res.* 2005; 46: 469-474
- Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Karlberg J, Groth T. Analysis of 24-hour growth hormone profiles in healthy boys and girls of normal stature: relation to puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78: 1195-1201

- Ali O, Cohen P, Lee KW. Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule. *Horm Metab Res.* 2003; 35: 726-733
- Almeida CR, Caires HR, Vasconcelos DP, Barbosa MA. NAP-2 Secreted by Human NK Cells Can Stimulate Mesenchymal Stem/Stromal Cell Recruitment. *Stem Cell Reports.* 2016; 6: 466-473
- Alvarez-Escolá C, Fernández-Rodríguez E, Recio-Córdova JM, Bernabéu-Morón I, Fajardo-Montañana C; Area for the Study of Endocrinology, Spanish Society for Endocrinology and Nutrition. Consensus document of the Neuroendocrinology area of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition on management of hypopituitarism during transition. *Endocrinol Nutr.* 2014; 61: 68.e1-68.e11
- Amézaga N, Sanjurjo L, Julve J, Aran G, Pérez-Cabezas B, Bastos-Amador P et al. Human scavenger protein AIM increases foam cell formation and CD36-mediated oxLDL uptake. *J Leukoc Biol.* 2014; 95: 509-520
- Andersen M. The robustness of diagnostic tests for GH deficiency in adults. *Growth Horm IGF Res.* 2015; 25: 108-114
- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002; 1: 845-867
- Andersson B, Decker R, Nierop AF, Bosaeus I, Albertsson-Wikland K, Hellgren G. Protein profiling identified dissociations between growth hormone-mediated longitudinal growth and bone mineralization in short prepubertal children. *J Proteomics.* 2011; 74: 89-100
- Andersson B, Hellgren G, Nierop AF, Hochberg Z, Albertsson-Wikland K. Proteins related to lipoprotein profile were identified using a pharmaco-proteomic approach as markers for growth response to growth hormone (GH) treatment in short prepubertal children. *Proteome Sci.* 2009. 2; 7: 40
- Angel PM, Caprioli RM. Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry: in situ molecular mapping. *Biochemistry.* 2013; 52: 3818-3828
- Anil KP, Frank CB, Ram KM. The Glomerular Podocyte as a Target of Growth Hormone Action: Implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Curr Diabetes Rev.* 2011; 7: 50-55
- Anjo SI, Santa C, Manadas B. SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. *Proteomics.* 2017; 17: 3-4.
- Argente J, Carrascosa A, García R, Rodríguez F. Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia 2ª ed. Madrid. Doyma. 2000a: 557-557

- Arrabal Vela MA, García Gijón CP, Pascual Martin M, Benet Giménez I, Áreas Del Águila V, Muñoz-Rodríguez JR et al. Adherence to somatotropin treatment administered with an electronic device. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2018. pii: S2530-0164(18)30072-7. doi: 10.1016/j.endinu.2018.02.003. [Epub ahead of print]
- Arsene CG, Kratzsch J, Henrion A. Mass spectrometry - an alternative in growth hormone measurement. *Bioanalysis.* 2014; 6: 2391-2402
- Asara JM, Christofk HR, Freimark LM, Cantley LC. A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen. *Proteomics.* 2008; 8: 994-999
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. 2000. *Nat Genet.* 200; 25: 25-29
- Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol.* 2011; 22: 176-185
- Attia N, Touzani A, Lahrichi M, Balafrej A, Kabbaj O, Girard-Globa A. Response of apolipoprotein AIV and lipoproteins to glycaemic control in young people with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1997; 14: 242-247
- Audí L, Fernández-Cancio M, Carrascosa A. Predictores de la respuesta al tratamiento con hormona de crecimiento. *Rev Esp Endocrinol Pediatr.* 2013; 4: 29-42
- Aurensanz Clemente E, Ayerza Casas A, Samper Villagrasa P, Ruiz Frontera P, Bueno Lozano G. Evaluation of cardiac function in a group of small for gestational age school-age children treated with growth hormone. *Med Clin (Barc).* 2017; 148: 101-106
- Awad H, El-Aneed A. Enantioselectivity of mass spectrometry: challenges and promises. *Mass Spectrom Rev.* 2013; 32: 466-483
- Bach LA, Hale LJ. Insulin-like growth factors and kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2015; 65: 327- 336
- Badawi A. The Potential of Omics Technologies in Lyme Disease Biomarker Discovery and Early Detection. *Infect Dis Ther.* 2017; 6: 85-102
- Bagnasco F, Di Iorgi N, Roveda A, Gallizia A, Haupt R, Maghnie M et al. Prevalence And Correlates of Adherence in Children and Adolescents Treated with Growth Hormone: a Multi-center Italian Study. *Endocr Pract.* 2017; 23: 929-941
- Bajpai A, Menon PS. Growth Hormone Therapy. *Indian J Pediatr.* 2005; 72: 139-144

- Baronio F, Mazzanti L, Girtler Y, Tamburrino F, Fazzi A, Lupi F et al. The Influence of Growth Hormone Treatment on Glucose Homeostasis in GrowthHormone-Deficient Children: A Six-Year Follow-Up Study. *Horm Res Paediatr.* 2016; 86: 196-200
- Baudet ML, Hassanali Z, Sawicki G, List EO, Kopchick JJ, Harvey S. Growth hormone action in the developing neural retina: a proteomic analysis. *Proteomics.* 2008; 8: 389-401
- Baumann GP. Growth hormone doping in sports: a critical review of use and detection strategies. *Endocr Rev.* 2012; 33: 155-186
- Bazarra-Castro MÁ, Sievers C, Schwarz HP, Pozza SB, Stalla GK. Changes in BMI and management of patients with childhood onset growth hormone deficiency in the transition phase. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012; 120: 507-510
- Beauregard C, Utz AL, Schaub AE, Nachtigall L, Biller BM, Miller KK et al. Growth hormone decreases visceral fat and improves cardiovascular risk markers in women with hypopituitarism: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 2063-2071
- Beentjes JA, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Effect of growth hormone replacement therapy on plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein activities in growth hormone-deficient adults. *J Lipid Res.* 2000; 41: 925-932
- Beentjes JA, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Low plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein activities in growth hormone deficient and acromegalic men: role in altered high density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2000; 153: 491-498
- Bell J, Parker KL, Swinford RD, Hoffman AR, Maneatis T, Lippe B. Long-term safety of recombinant human growth hormone in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 167– 177
- Benso A, Calvi E, Gramaglia E, Olivetti I, Tomelini M, Ghigo E et al. Other than growth hormone neuroendocrine actions of ghrelin. *Endocr Dev.* 2013; 25: 59-68
- Bergan HE, Kittilson JD, Sheridan MA. Nutritional state modulates growth hormone-stimulated lipolysis. *Gen Comp Endocrinol.* 2015; 217-218: 1-9
- Bergan-Roller HE, Sheridan MA. The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen Comp Endocrinol.* 2018; 258: 119-133
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009; 23: 781–783
- Besedovsky H, Sorkin E. Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol.* 1977; 27: 1-12

- Beshyah SA, Gelding SV, Andres C, Johnston DG, Gray IP. Beta-cell function in hypopituitary adults before and during growth hormone treatment. *Clin Sci (Lond)*. 1995; 89: 321-328
- Binay C, Simsek E, Yıldırım A, Kosger P, Demiral M, Kılıç Z. Growth hormone and the risk of atherosclerosis in growth hormone-deficient children. *Growth Horm IGF Res*. 2015; 25: 294-297
- Binder G, Huller E, Blumenstock G, Schweizer R. Auxology-based cut-off values for biochemical testing of GH secretion in childhood. *Growth Horm IGF Res*. 2011; 21: 212-218
- Binder G. Growth hormone deficiency: new approaches to the diagnosis. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2011; 9: 535-537
- Binnerts A, Swart GR, Wilson JH, Hoogerbrugge N, Pols HA, Birkenhager JC&Lamberts SW. The effect of growth hormone administration in growth hormone deficient adults on bone, protein, carbohydrate and lipid homeostasis, as well as on body composition. *Clin Endocrinol*. 1992; 37: 79-87
- Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69: 89-95
- Birla S, Khadgawat R, Jyotsna VP, Jain V, Garg MK, Bhalla AS et al. Identification of novel GHRHR and GH1 mutations in patients with isolated growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res*. 2016a; 29: 50-56
- Birla S, Khadgawat R, Jyotsna VP, Jain V, Garg MK, Bhalla AS et al. Identification of Novel PROP1 and POU1F1 Mutations in Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Horm Metab Res*. 2016b; 48: 822-827
- Birzniece V, Nelson AE, Ho KK. Growth hormone and physical performance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011; 22: 171-178
- Bizzarri C, Lonero A, Delvecchio M, Cavallo L, Faienza MF, Giordano M et al. Growth hormone treatment improves final height and nutritional status of children with chronic kidney disease and growth deceleration. *J Endocrinol Invest*. 2018; 41: 325-331
- Black DD, Ellinas H. Apolipoprotein synthesis in newborn piglet intestinal explants. *Pediatr Res*. 1992; 32: 553-558
- Blum W, Alherbish A, Alsagheir A, El Awwa A, Kaplan W, Koledova E et al. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in the diagnosis and treatment of growth disorders. *Endocr Connect*. 2018. pii: EC-18-0099. doi: 10.1530/EC-18-0099. [Epub ahead of print]
- Bo M, Raspo S, Morra F, Cassader M, Isaia G, Poli L. Body fat is the main predictor of fibrinogen levels in healthy non-obese men. *Metabolism*. 2004; 53: 984-988

- Bonder MJ, Luijk R, Zhernakova DV, Moed M, Deelen P, Vermaat M et al. Disease variants alter transcription factor levels and methylation of their binding sites. *Nat Genet.* 2017; 49: 131-138
- Boot AM, Engels MA, Boerma GJ, Krenning EP, De Muinck Keizer-Schrama SM. Changes in bone mineral density, body composition, and lipid metabolism during growth hormone (GH) treatment in children with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 2423-2428
- Bosch J, Ueki M, Such-Sanmartín G, Segura J, Gutiérrez-Gallego R. Tracking growth hormone abuse in sport: a comparison of distinct isoform-based assays. *Anal Chim Acta.* 2012; 733: 56-63
- Bradburne C, Graham D, Kingston HM, Brenner R, Pamuku M, Carruth L. Overview of 'Omics Technologies for Military Occupational Health Surveillance and Medicine. *Mil Med.* 2015; 180: 34-48
- Brinkman JE, Sharma S. Physiology, Growth Hormone. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018
- Brooks AJ, Waters MJ. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2010; 6: 515-525
- Brothers JF, Hijazi K, Mascaux C, El-Zein RA, Spitz MR, Spira A. Bridging the clinical gaps: genetic, epigenetic and transcriptomic biomarkers for the early detection of lung cancer in the post-National Lung Screening Trial era. *BMC Med.* 2013; 11: 168
- Burkhart PV, Sabaté E. Adherence to long-term therapies: evidence for action. *J Nurs Scholarsh* 2003; 35: 207.
- Byrne TA, Morrissey TB, Nattakom TV, Ziegler TR, Wilmore DW. Growth hormone, glutamine, and a modified diet enhance nutrient absorption in patients with severe short bowel syndrome. *J Parenter Enteral Nutr.* 1995a; 19: 296-302
- Byrne TA, Persinger RL, Young LS, Ziegler TR, Wilmore DW. A new treatment for patients with short-bowel syndrome. Growth hormone, glutamine, and a modified diet. *Ann Surg.* 1995b; 222: 243-54
- Cutfield WS, Lundgren F. Insulin-like growth factor I and growth responses during the first year of growth hormone treatment in KIGS patients with idiopathic growth hormone deficiency, acquired growth hormone deficiency, turner syndrome and born small for gestational age. *Horm Res.* 2009; 71: 39-45
- Caicedo D, Díaz O, Devesa P, Devesa J. Growth Hormone (GH) and Cardiovascular System. *Int J Mol Sci.* 2018; 19. pii: E290. doi: 10.3390/ijms19010290

- Cañete Estrada R, Gil Campos M. Déficit de hormona de crecimiento. En: Pombo Tratado de Endocrinología Pediátrica. 4ª ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. 2009: 284-298
- Cañete Estrada R, Valle Jiménez M, Martos Estepa R, Cañete Vázquez MD. Cambios en la concentración de colesterol total y LDL-c se asocian con modificaciones en la molécula de adhesión intercelular-1 en niños prepúberes, no obesos, con DGH, tratados con GH. Rev Esp Endocrinol Pediatr 2017a; 8 (supl): 188-189
- Cañete MD, Valle M, Martos R, Jiménez-Reina L, Cañete R. Efectos a corto plazo del tratamiento con hormona de en niños prepuberales con déficit de GH sobre parámetros metabólicos y el perfil de adipokinas. Rev Esp Pediatr. 2017b; 73: 276
- Cañete MD, Valle M, Martos R, van Donkelaar EL, Cañete R. Growth Hormone Deficiency in Children. Chapter 3. In: Leon V. Berhardt. Editor. Advance in Medicine and Biology. New York, Nova Biomedical. 2015: Volume 84. P. 39-64
- Cañete R, Caballero-Villarraso J, Aguilar-Quintero M, Vázquez-Rueda F. Beneficial effects of growth hormone therapy for ossification defects after bone distraction in X linked hypophosphataemic rickets. BMJ Case Rep. 2014a; 2014
- Cañete R, Valle M, Martos R, Cañete MD, van Donkeelar EL. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Pediatrics: Genetic Factors, Functions and Clinical Applications. In: Rutherford JM. Ed. Plasminogen Activator Genetic Factors Functions and Clinical Applications. Protein Biochemistry, Synthesis. Structure and Cellular Fintions. New York, Nova Biomedical. 2014b: 69-96
- Cañete R, Valle M, Martos R, Sánchez-Carrión A, Cañete MD, van Donkelaar EL. Short-term effects of GH treatment on coagulation, fibrinolysis, inflammation biomarkers, and insulin resistance status in prepubertal children with GH deficiency. Eur J Endocrinol. 2012; 167: 255-260
- Capalbo D, Barbieri F, Improda N, Giallauria F, Di Pietro E, Rapacciuolo A et al. Growth Hormone Improves Cardiopulmonary Capacity and Body Composition in Children With Growth Hormone Deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2017; 102: 4080-4088
- Capalbo D, Esposito A, Di Mase R, Barbieri F, Parenti G, Vajro P et al. Update on early cardiovascular and metabolic risk factors in children and adolescents affected with growth hormone deficiency. Minerva Endocrinol. 2012; 37: 379-389
- Capalbo D, Lo Vecchio A, Farina V, Spinelli L, Palladino A, Tiano C et al. Subtle alterations of cardiac performance in children with growth hormone deficiency: results of a two-year prospective, case-control study. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94: 3347-3355

- Capalbo D, Mattace Raso G, Esposito A, Di Mase R, Barbieri F, Meli R et al. Cluster of cardiometabolic risk factors in children with GH deficiency: a prospective, case-control study. *Clin Endocrinol*. 2014; 80: 856–862
- Capelo JL, Carreira R, Diniz M, Fernandes L, Galesio M, Lodeiro C et al. Overview on modern approaches to speed up protein identification workflows relying on enzymatic cleavage and mass spectrometry-based techniques. *Anal Chim Acta*. 2009; 650: 151-159
- Cappa M, Caruso M, Saggese G, Salerno MC, Tonini G. GH therapy in transition age: state of the art and future perspectives. *Minerva Endocrinol*. 2015; 40: 23-35
- Cappa M, Iughetti L, Loche S, Maghnie M, Vottero A; GeNeSIS National Board on behalf of the GeNeSIS Italian Investigators. Efficacy and safety of growth hormone treatment in children with short stature: the Italian cohort of the GeNeSIS clinical study. *J Endocrinol Invest*. 2016; 39: 667-677
- Carel JC, Butler G. Safety of recombinant human growth hormone. *Endocr Dev*. 2010; 18: 40-54
- Carreira MC, Crujeiras AB, Andrade S, Monteiro MP, Casanueva FF. Ghrelin as a GH-releasing factor. *Endocr Dev*. 2013; 25: 49-58
- Carrilho AJ, Cunha-Neto MB, Nunes VS, Lottenberg AM, Medina WL, Nakandakare ER et al. Plasma cholesteryl ester transfer protein and lipoprotein levels during treatment of growth hormone-deficient adult humans. *Lipids*. 2001; 36:549-554
- Castro-Feijóo L, Loidi L, Cabanas P, Pombo M, Barreiro J. Presente y futuro en el tratamiento de la talla baja disarmónica. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*. 2015; 6: 21-24
- Cereda A, Kravchuk AV, D'Amato A, Bachi A, Righetti PG. Proteomics of wine additives: mining for the invisible via combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteomics*. 2010; 73: 1732-1739
- Chapman JD, Goodlett DR, Masselon CD. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. *Mass Spectrom Rev*. 2014; 33: 452-470
- Chaves VE, Júnior FM, Bertolini GL. The metabolic effects of growth hormone in adipose tissue. *Endocrine*. 2013; 44: 293-302
- Chelius D, Bondarenko PV. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2002; 1: 317-323
- Chen J, Gremeaux L, Fu Q, Liekens D, Van Laere S, Vankelecom H. Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. *Stem Cells*. 2009; 27: 1182–1195

- Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Deneef C, Vankelecom H. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology*. 2005; 146:3985–3998
- Chen JW, Ledet T, Orskov H, Jessen N, Lund S, Whittaker J et al. A highly sensitive and specific assay for determination of IGF-I bioactivity in human serum. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 284: E1149-55
- Chen M, Gan D, Luo Y, Rampersad S, Xu L, Yang S et al. Effect of recombinant human growth hormone therapy on blood lipid and carotid intima-media thickness in children with growth hormone deficiency. *Pediatr Res*. 2018 Jan 17. doi: 10.1038/pr.2017.271. [Epub ahead of print]
- Chesover AD, Dattani MT. Evaluation of growth hormone stimulation testing in children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016; 84: 708-714.
- Chikani V, Ho KK. Action of GH on skeletal muscle function: molecular and metabolic mechanisms. *J Mol Endocrinol*. 2014; 52: R107-123
- Child CJ, Zimmermann AG, Jia N, Robison LL, Brämswig JH, Blum WF. Assessment of Primary Cancer Incidence in Growth Hormone-Treated Children: Comparison of a Multinational Prospective Observational Study with Population Databases *Horm Res Paediatr*. 2016; 85: 198–206
- Chinoy A, Murray PG. Diagnosis of growth hormone deficiency in the paediatric and transitional age. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016; 30: 737-747
- Choi SH, Fan D², Hwang MS³, Lee HK⁴, Hwang CJ⁵. Effect of growth hormone treatment on craniofacial growth in children: Idiopathic short stature versus growth hormone deficiency. *J Formos Med Assoc*. 2017; 116: 313-321
- Choukair D, Hugel U, Sander A, Uhlmann L, Tonshoff B. Inhibition of IGF-I-related intracellular signaling pathways by proinflammatory cytokines in growth plate chondrocytes. *Pediatr Res*. 2014; 76: 245–251
- Christiansen JS, Backeljauw PF, Bidlingmaier M, Biller BM, Boguszewski MC, Casanueva FF et al. Growth Hormone Research Society perspective on the development of long-acting growth hormone preparations. *Eur J Endocrinol*. 2016; 174: C1-8
- Ciresi A, Amato MC, Criscimanna A, Mattina A, Vetro C, Galluzzo A et al. Metabolic parameters and adipokine profile during GH replacement therapy in children with GH deficiency. *Eur J Endocrinol*. 2007;156:353-360

- Ciresi A, Pizzolanti G, Leotta M, Guarnotta V, Teresi G, Giordano C. Resistin, visfatin, leptin and omentin are differently related to hormonal and metabolic parameters in growth hormone-deficient children. *J Endocrinol Invest*. 2016; 39: 1023-1030
- Cittadini A, Marra AM, Arcopinto M, Bobbio E, Salzano A, Sirico D et al. Growth hormone replacement delays the progression of chronic heart failure combined with growth hormone deficiency: an extension of a randomized controlled single-blind study. *JACC Heart Fail*. 2013; 1: 325-330
- Claude L, Laprie A. [Which dose constraints on which critical organs in paediatric radiation therapy?]. *Cancer Radiother*. 2015; 19: 484-488
- Clayton P, Chatelain P, Tatò L, Yoo HW, Ambler GR, Belgorosky A et al. A pharmacogenomic approach to the treatment of children with GH deficiency or Turner syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2013; 169: 277-289
- Clayton PE, Cowell CT. Safety issues in children and adolescents during growth hormone therapy--a review. *Growth Horm IGF Res*. 2000; 10: 306-317
- Coghlan RF, Oberdorf JA, Sienko S, Aiona MD, Boston BA, Connelly KJ et al. A degradation fragment of type X collagen is a real-time marker for bone growth velocity. *Sci Transl Med*. 2017; 9(419)
- Cohen P, Germak J, Rogol AD, Weng W, Kappelgaard AM, Rosenfeld RG et al. Variable degree of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) sensitivity in children with idiopathic short stature compared with GH-deficient patients: evidence from an IGF-based dosing study of short children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 2089-2098
- Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL et al. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93: 4210-4217
- Colao A, Marzullo P, Di Somma C, Lombardi G. Growth hormone and the heart. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001; 54: 137-154
- 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*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 3990-3993
- Córdova Martínez A. Adenohipófisis. En: Córdova. *Fisiología Dinámica*. Barcelona. Masson. 2003: 550-560

- Cornier MA, Despres JP, Davis N, Grossniklaus DA, Klein S, Lamarche B et al. Assessing adiposity: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011; 124: 1996–2019
- Courtillot C, Baudoin R, Du Souich T, Saadjian L, Tejedor I, Pinto G et al. Monocentric study of 112 consecutive patients with childhood onset GH deficiency around and after transition. *Eur J Endocrinol*. 2013; 169: 587-596
- Cox HD, Lopes F, Woldemariam GA, Becker JO, Parkin MC, Thomas A et al. Interlaboratory agreement of insulin-like growth factor 1 concentrations measured by mass spectrometry. *Clin Chem*. 2014; 60: 541-548
- Craft GE, Chen A, Nairn AC. Recent advances in quantitative neuroproteomics. *Methods*. 2013; 61: 186-218
- Criterios de inclusión para tratamiento con rhGH en niños en insuficiencia renal crónica (normas del Ministerio de Sanidad y Consumo). Disponible en: <https://www.msssi.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/criteriosHCninos020908.pdf>
- Cruz-Topete D, Christensen B, Sackmann-Sala L, Okada S, Jorgensen JOL & Kopchick JJ. Serum proteome changes in acromegalic patients following transsphenoidal surgery: novel biomarkers of disease activity. *Eur J Endocrinol*. 2011a; 164: 157–167
- Cruz-Topete D, Jorgensen JOL, Christensen B, Sackmann-Sala L, Krusenstjerna-Hafstrøm T, Jara A et al. Identification of new biomarkers of low-dose GH replacement therapy in GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2011b; 96: 2089–2097
- Curtis H, Schnek A. *Biología*. Edición 7ª. Ciudad. Panamericana. 2008
- Cutfield WS, Derraik JG, Gunn AJ, Reid K, Delany T, Robinson E et al. Non-compliance with growth hormone treatment in children is common and impairs linear growth. *PLoS One*. 2011 31; 6: e16223
- Cutfield WS, Lundgren F. Insulin-like growth factor I and growth responses during the first year of growth hormone treatment in KIGS patients with idiopathic growth hormone deficiency, acquired growth hormone deficiency, turner syndrome and born small for gestational age. *Horm Res*. 2009; 71 Suppl 1: 39-45
- Dahlgren J, Krüström B, Niklasson A, Nierop AF, Rosberg S, Albertsson-Wikland K. Models predicting the growth response to growth hormone treatment in short children independent of GH status, birth size and gestational age. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2007; 7: 40
- David A, Hwa V, Metherell LA, Netchine I, Camacho-Hübner C, Clark AJ et al. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity. *Endocr Rev*. 2011; 32: 472-497

- De Leonibus C, De Marco S, Stevens A, Clayton P, Chiarelli F, Mohn A. Growth Hormone Deficiency in Prepubertal Children: Predictive Markers of Cardiovascular Disease. *Horm Res Paediatr.* 2016; 85: 363-371
- De Marco S, Marcovecchio ML, Caniglia D, De Leonibus C, Chiarelli F, Mohn A. Circulating asymmetric dimethylarginine and lipid profile in pre-pubertal children with growth hormone deficiency: effect of 12-month growth hormone replacement therapy. *Growth Horm IGF Res.* 2014; 216-220
- De Pedro S, Murillo M, Salinas I, Granada ML, Martinez M, Puig-Domingo M et al. Variability in adherence to rhGH treatment: Socioeconomic causes and effect on children's growth. *Growth Horm IGF Res.* 2016; 26: 32-35
- De Sanctis V, Soliman AT, Yassin M, Di Maio S. Is priming with sex steroids useful for defining patients who will benefit from GH treatment?. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014;11: 284-287
- Decker R, Andersson B, Nierop AF, Bosaeus I, Dahlgren J, Albertsson-Wikland K et al. Protein markers predict body composition during growth hormone treatment in short prepubertal children. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013; 79: 675-682
- Declerck PJ, Darendeliler F, Góth M, Kolouskova S, Micle I, Noordam C et al. Biosimilars: controversies as illustrated by rhGH. *Curr Med Res Opin.* 2010; 26: 1219-1229
- Dehkhoda F, Lee CMM, Medina J, Brooks AJ. The Growth Hormone Receptor: Mechanism of Receptor Activation, Cell Signaling, and Physiological Aspects. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; 9: 35
- Di Minno MN, Pezzullo S, Palmieri V, Di Somma C, Lupoli R, Valle D et al. Protein C and protein S changes in GH-deficient adults on r-HGH replacement therapy: correlations with PAI-1 and t-PA plasma levels. *Thromb Res.* 2010;126:e434-438
- Dilla T, Valladares A, Lizán L, Sacristán JA. [Treatment adherence and persistence: causes, consequences and improvement strategies]. *Aten Primaria.* 2009; 41: 342-348
- Dioufa N, Schally AV, Chatzistamou I, Moustou E, Block NL, Owens GK et al. Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 18611-18615
- Dobie R, Ahmed SF, Staines KA, Pass C, Jasim S, MacRae VE et al. Increased linear bone growth by GH in the absence of SOCS2 is independent of IGF-1. *J Cell Physiol.* 2015; 230: 2796-2806
- Doessing S, Heinemeier KM, Holm L, Mackey AL, Schjerling P, Rennie M et al. Growth hormone stimulates the collagen synthesis in human tendon and skeletal muscle without affecting myofibrillar protein synthesis. *J Physiol.* 2010a; 588:341-351

- Doi T, Liu M, Seeley RJ, Woods SC, Tso P. Effect of leptin on intestinal apolipoprotein AIV in response to lipid feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281: R753-R759
- Doknic M, Stojanovic M, Popovic V. Novel long-acting GH preparations. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2014; 12: 206-212
- Dorman JS, Schmella MJ, Wesmiller SW. Primer in Genetics and Genomics, Article 1: DNA, Genes and Chromosomes. *Biol Res Nurs*. 2016. pii: 1099800416678321. [Epub ahead of print]
- Dorshkind K, Welniak L, Gault RA, Hixon J, Montecino-Rodriguez E, Horseman ND et al. Effects of housing on the thymic deficiency in dwarf mice and its reversal by growth hormone administration. *Clin Immunol*. 2003; 109: 197-202
- Duchateau PN, Movsesyan I, Yamashita S, Sakai N, Hirano K, Schoenhaus SA et al. Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects. *J Lipid Res*. 2000; 41: 1231-1236
- Duchén K, Lindberg A, Kiplok K, Kriström B. Using a spontaneous profile rather than stimulation test makes the KIGS idiopathic growth hormone deficiency model more accessible for clinicians. *Acta Paediatr*. 2017; 106: 1481-1486
- Dulin D, Lipfert J, Moolman MC, Dekker NH. Studying genomic processes at the single molecule level: introducing the tools and applications. *Nat Rev Genet*. 2012; 14: 9–22
- Dullaart RP, van den Berg G, van der Knaap AM, Dijck-Brouwer J, Dallinga-Thie GM, Zelissen PM et al. HDL cholesterol response to GH replacement is associated with common cholesteryl ester transfer protein gene variation (-629C>A) and modified by glucocorticoid treatment. *Eur J Endocrinol*. 2010; 162:227-234
- Dumrongpisutikul N, Chuajak A, Lerdlum S. Pituitary height at magnetic resonance imaging in pediatric isolated growth hormone deficiency. *Pediatr Radiol*. 2018; 48: 694-700
- Duran-Ortiz S, Brittain AL, Kopchick JJ. The impact of growth hormone on proteomic profiles: a review of mouse and adult human studies. *Clin Proteomics*. 2017. 29; 14:24
- Edens A, Talamantes F. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev*. 1998; 19: 559-582
- Ehlert JE, Gerdes J, Flad HD, Brandt E. Novel C-terminally truncated isoforms of the CXC chemokine beta-thromboglobulin and their impact on neutrophil functions. *J Immunol*. 1998; 161: 4975-4982
- Ehlert JE, Petersen F, Kubbutat MH, Gerdes J, Flad HD, Brandt E. Limited and defined truncation at the C terminus enhances receptor binding and degranulation activity of the neutro-

- phil-activating peptide 2 (NAP-2). Comparison of native and recombinant NAP-2 variants. *J Biol Chem.* 1995; 270: 6338-6344
- ElSayed SA, Bhimji SS. Physiology, Endocrine, Pituitary Gland. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-2017
- Ergun-Longmire B, Mertens AC, Mitby P, Qin J, Heller G, Shi W et al. Growth hormone treatment and risk of second neoplasms in the childhood cancer survivor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 3494–3498
- Ermert D, Blom AM. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett.* 2016;169: 82-92
- Esposito V, Di Biase S, Lettieri T, Labella D, Simeone R, Salerno M. Serum homocysteine concentrations in children with growth hormone (GH) deficiency before and after 12 months GH replacement. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004; 61: 607-611
- Esteve C, D'Amato A, Marina ML, García MC, Righetti PG. Identification of avocado (*Persea americana*) pulp proteins by nano-LC-MS/MS via combinatorial peptide ligand libraries. *Electrophoresis.* 2012; 33: 2799-2805
- European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology derived proteins as active substance: quality issues. London (GB): Committee for Medicinal Products for Human Use; 2006 (Last accessed 2 February 2010). Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/10/WC500176768.pdf
- Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 2907–2912
- Feingold K, Brinton EA, Grunfeld C. The Effect of Endocrine Disorders on Lipids and Lipoproteins. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M10, Purnell J11, Rebar R12, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.2017
- Feld S, Hirschberg R. Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr Rev.* 1996; 17: 423–480
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989; 246: 64-71

- Ferro P, Gutiérrez-Gallego R, Bosch J, Farré M, Segura J. Fit-for-Purpose Radio Receptor Assay for the Determination of Growth Hormone Secretagogues in Urine. *J Biomol Screen*. 2015; 20: 1268-1276
- Ferro P, Ventura R, Pérez-Mañá C, Farré M, Segura J. See comment in PubMed Commons below Genetic and protein biomarkers in blood for the improved detection of GH abuse. *J Pharm Biomed Anal*. 2016; 128: 111-118
- Fleming T, Martínez-Moreno CG, Mora J, Aizouki M, Luna M, Arámburo C, Harvey S. Internalization and synaptogenic effect of GH in retinal ganglion cells (RGCs). *Gen Comp Endocrinol*. 2016; 234: 151-160
- Freedman BI, Skorecki K. Gene-gene and gene-environment interactions in apolipoprotein L1 gene-associated nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014; 9: 2006-2013
- Frystyk J. The growth hormone hypothesis - 2005 revision. *Horm Metab Res*. 2005; 37: 44-48
- Fujita M, Ieguchi K, Cedano-Prieto DM, Fong A, Wilkerson C, Chen JQ et al. An integrin binding-defective mutant of insulin-like growth factor-1 (R36E/R37E IGF1) acts as a dominant-negative antagonist of the IGF1 receptor (IGF1R) and suppresses tumorigenesis but still binds to IGF1R. *J Biol Chem*. 2013a; 288: 19593-19603
- Fujita M, Ieguchi K, Davari P, Yamaji S, Taniguchi Y, Sekiguchi K et al. Cross-talk between integrin $\alpha 6\beta 4$ and insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) through direct $\alpha 6\beta 4$ binding to IGF1 and subsequent $\alpha 6\beta 4$ -IGF1-IGF1R ternary complex formation in anchorage-independent conditions. *J Biol Chem*. 2012; 287: 12491-12500
- Fujita M, Takada YK, Takada Y. Insulin-like growth factor (IGF) signaling requires $\alpha v\beta 3$ -IGF1-IGF type 1 receptor (IGF1R) ternary complex formation in anchorage independence, and the complex formation does not require IGF1R and Src activation. *J Biol Chem*. 2013b; 288: 3059-3069
- Gallardo JM, Carrera M, Ortea I. Proteomics In Food Science. Chapter 5. In: Alejandro Cifuentes. Editor. *Foodomics: Advanced Mass Spectrometry in Modern Food Science and Nutrition*, First Edition. John Wiley & Sons, Inc. 2013: Volume xx. P. 125-165
- Galletto C, Gliozzi A, Nucera D, Bertorello N, Biasin E, Corrias A et al. Growth impairment after TBI of leukemia survivors children: a model-based investigation. *Theor Biol Med Model*. 2014; 11: 44
- Gallien S, Duriez E, Domon B. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J Mass Spectrom*. 2011; 46: 298-312

- Galli-Tsinopoulou A, Kotanidou EP, Kleisarchaki AN, Kauli R, Laron Z. A novel variant c.97C>T of the Growth Hormone Releasing Hormone Receptor gene causes isolated growth hormone deficiency type Ib. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2018. doi: 10.4274/jcrpe.5188. [Epub ahead of print]
- Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Japon MA et al. A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS One*. 2009; 4: e4815
- Garcia-Martinez E, Rojas JP, Cañete MD, Bernal G, Cañete R, Jiménez-Reina L. Antagonism between Ghrelin/GH secretagogues and somatostatin in arcuate and periventricular nuclei in prepuberal female rats. *Eur J Anat*. 2009; 13: 83-90
- Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 6940-6945
- Geromanos SJ, Vissers JPC, Silva JC, Dorschel CA, Li G-Z, Gorenstein MV et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics*. 2009;9: 1683–1695
- Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11: O111.016717
- Giménez Gómez R, Ríos Jiménez D, Cañete Vázquez MD, García Catalán R, Cañete Estrada R. Valoración del grosor retiniano macular y de células ganglionares en niños tratados con hormona de crecimiento. 38 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica. Córdoba. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2016. 7 (Suppl): 107-108. En proceso de publicación
- Giustina A, Scalvini T, Tassi C, Desenzani P, Poiesi C, Wehrenberg WB et al. Maturation of the regulation of growth hormone secretion in young males with hypogonadotropic hypogonadism pharmacologically exposed to progressive increments in serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 1210-1219
- Gola M, Bonadonna S, Doga M, Giustina A. Clinical review: growth hormone and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 1864–1870
- Gola M, Giustina A. Growth hormone deficiency and cardiovascular risk: do we need additional markers?. *Endocrine*. 2012; 42: 240-242
- Gomberg-Maitland M, Frishman WH. Recombinant growth hormone: a new cardiovascular drug therapy. *Am Heart J*. 1996; 132: 1244-1262
- Gómez JM, Sahún M, Vila R, Domènech P, Catalina P, Soler J et al. Peripheral fibrinolytic markers, soluble adhesion molecules, inflammatory cytokines and endothelial function

- in hypopituitary adults with growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006; 64:632-639
- Gómez-Guzmán E; Cañete MD; Valle-Jiménez M; Caballero-Villarraso J; Cañete R. Effects of growth hormone treatment on the heart in children with GH deficiency. 54TH Annual Meeting of the European Society for Paediatrics Endocrinology. Barcelona, Spain, October 1-3, 2015. *Hor Res Paediatr*. 2015; 84, S1,15: 244
- Gómez-Guzmán E, Cañete MD, Valle-Martos R, Cañete R, Valle M, Jiménez-Reina L et al. Short-Term Evaluation of Left Ventricular Mass and Function in Children With Growth Hormone Deficiency After Replacement Treatment. *Front Pediatr*. 2018; 19;6:174. eCollection 2018
- Gönç EN, Yordam N, Kandemir N, Alikasifoglu A. Comparison of stimulated growth hormone levels in primed versus unprimed provocative tests. Effect of various testosterone doses on growth hormone levels. *Horm Res*. 2001; 56: 32-37
- Gonzalez S, Sathyapalan T, Javed Z, Atkin SL. Effects of Growth Hormone Replacement on Peripheral Muscle and Exercise Capacity in Severe Growth Hormone Deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;23;9:56. eCollection 2018
- Goto Y, Aoyama M, Sekiya T, Kakita H, Waguri-Nagaya Y, Miyazawa K et al. CXCR4+ CD45- Cells are Niche Forming for Osteoclastogenesis via the SDF-1, CXCL7, and CX3CL1 Signaling Pathways in Bone Marrow. *Stem Cells*. 2016; 34: 2733-2743
- Gounden V, Jialal I. Hypopituitarism (Panhypopituitarism). In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-. 2017
- Grimberg A, DiVall SA, Polychronakos C, Allen DB, Cohen LE, Quintos JB et al. Drug and Therapeutics Committee and Ethics Committee of the Pediatric Endocrine Society. 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. *Horm Res Paediatr*. 2016; 86: 361-397
- Growth Hormone Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and Adolescence: Summary statement of the GH research society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 3990-3993
- Guo Q, Jian Z, Jia B, Chang L. CXCL7 promotes proliferation and invasion of cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2017; 37: 1114-1122
- Gupta D, Gardner M, Whaley-Connell A. Role of Growth Hormone Deficiency and Treatment in Chronic Kidney Disease. *Cardiorenal Med*. 2011; 1: 174-182

- Guzzetti C, Ibba A, Pilia S, Beltrami N, Di Iorgi N, Rollo A et al. 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. *Eur J Endocrinol*. 2016; 175: 41-47
- Halac I, Zimmerman D. Managing growth hormone treatment in pediatric patients. *Pediatr Ann*. 2004; 33: 183-188
- Hansen M, Boesen A, Holm L, Flyvbjerg A, Langberg H, Kjaer M. Local administration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates tendon collagen synthesis in humans. *Scand J Med Sci Sports*. 2013; 23: 614–619
- Harvey S, Kakebeeke M, Murphy AE, Sanders EJ. Growth hormone in the nervous system: autocrine or paracrine roles in retinal function?. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003; 81: 371-384
- Harvey S, Martin BT, Baudet ML, Davis P, Sauve Y, Sanders EJ. Growth hormone in the visual system: comparative endocrinology. *Gen Comp Endocrinol*. 2007; 153: 124-131
- Harvey S, Parker E, Macdonald I, Sanders EJ. Growth hormone is present in the human retina and vitreous fluid. *Neurosci Lett*. 2009; 455: 199-202
- Hauffa BP, Touraine P, Urquhart-Kelly T, Koledova E. Managing Transition in Patients Treated with Growth Hormone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8: 346.eCollection 2017
- He JS, Lian CW, Zhou HW, Lin XF, Yang HC, Ye XL et al. The correlation of leptin/leptin receptor gene polymorphism and insulin-like growth factor-1 and their impact on childhood growth hormone deficiency. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20: 3642-3647
- Healy ML, Russell-Jones D. Growth hormone and sport: abuse, potential benefits, and difficulties in detection, *Br J Sports Med*. 31; 1997: 267–268
- Heidecker B, Kittleson MM, Kasper EK, Wittstein IS, Champion HC, Russell SD et al. Transcriptional biomarkers for the accurate diagnosis of myocarditis. *Circulation* 2011; 123: 1174–1184
- Hilczer M, Smyczynska J, Stawerska R, Lewinski A. Effects of one year low-dose growth hormone (GH) therapy on body composition, lipid profile and carbohydrate metabolism in young adults with childhood-onset severe GH deficiency confirmed after completion of growth promotion. *Endokrynologia Polska*. 2008; 59: 292-300
- Holewinski RJ, Parker SJ, Matlock AD, Venkatraman V, Van Eyk JE. Methods for SWATH™: Data Independent Acquisition on TripleTOF Mass Spectrometers. *Methods Mol Biol*. 2016; 1410:265-279

- Holl RW, Hartman ML, Veldhuis JD, Taylor WM, Thorner MO. Thirty-second sampling of plasma growth hormone in man: correlation with sleep stages. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 72: 854-861
- Holt RI, Böhning W, Guha N, Bartlett C, Cowan DA, Giraud S et al. The development of decision limits for the GH-2000 detection methodology using additional insulin-like growth factor-I and amino-terminal pro-peptide of type III collagen assays. *Drug Test Anal.* 2015; 7: 745-755
- Holt RI. Detecting growth hormone abuse in athletes. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 401: 449-462
- Hong GK, Payne SC, Jane JA Jr. Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland. *Otolaryngol Clin North Am.* 2016; 49: 21-32
- Horber FF, Haymond MW. Human growth hormone prevents the protein catabolic side effects of prednisone in humans. *J Clin Invest.* 1990; 86: 265-272
- Hu CA, Klopfer EI, Ray PE. Human apolipoprotein L1 (ApoL1) in cancer and chronic kidney disease. *FEBS Lett.* 2012; 586: 947-955
- Huang L, Tan HY, Fogarty MJ, Andrews ZB, Veldhuis JD, Herzog H et al. Actions of NPY, and its Y1 and Y2 receptors on pulsatile growth hormone secretion during the fed and fasted state. *J Neurosci.* 2014; 34: 16309-16319
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews.* 1999; 20: 761-787
- Ilhan A, Gartner W, Nabokikh A, Daneva T, Majdic O, Cohen G et al. Localization and characterization of the novel protein encoded by C20orf3. *Biochem J.* 2008; 414: 485-495
- Improda N, Capalbo D, Esposito A, Salerno M. Muscle and skeletal health in children and adolescents with GH deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016; 30: 771-783
- Inzaghi E, Cianfarani S. The Challenge of Growth Hormone Deficiency Diagnosis and Treatment during the Transition from Puberty into Adulthood. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4:34
- Isgaard J, Arcopinto M, Karason K, Cittadini A. GH and the cardiovascular system: an update on a topic at heart. *Endocrine.* 2015; 48: 25-35
- Ishihara M. Optic hypoplasia with pituitary dwarfism (Kaplan-Grumbach-Hoyt syndrome, or DeMorsier syndrome). *Endocrinol Jpn.* 1983; 30: 7-14
- Jacobs JM, Adkins JN, Qian WJ, Liu T, Shen Y, Camp DG et al. Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J Proteome Res.* 2005; 4: 1073-1085

- Jarfelt M, Bjarnason R, Lannering B. Young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: spontaneous GH secretion in relation to CNS radiation. *Pediatr Blood Cancer*. 2004; 42: 582-588
- Jenkins PJ, Mukherjee A, Shalet SM. Does growth hormone cause cancer?. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006; 64: 115-121
- Johannsson G, Bidlingmaier M, Biller BMK, Boguszewski M, Casanueva FF, Chanson P et al. Growth Hormone Research Society perspective on biomarkers of GH action in children and adults. *Endocr Connect*. 2018; 7: R126-134
- Johansson JO, Landin K, Tengborn L, Rosén T, Bengtsson BA. High fibrinogen and plasminogen activator inhibitor activity in growth hormone-deficient adults. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 434-437
- Jørgensen JO, Møller N, Lauritzen T, Alberti KG, Orskov H, Christiansen JS. Evening versus morning injections of growth hormone (GH) in GH-deficient patients: effects on 24-hour patterns of circulating hormones and metabolites. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990; 70: 207-214
- Kamenicky P, Mazziotti G, Lombes M, Giustina A, Chanson P. Growth hormone, insulin-like growth factor-1, and the kidney: pathophysiological and clinical implications. *Endocr Rev*. 2014; 35: 234-281
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28: 27-30
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 1988; 60: 2299-2301
- Kearney T, Navas de Gallegos C, Chrisoulidou A, Gray R, Bannister P, Venkatesan S et al. Hypopituitarism is associated with triglyceride enrichment of very low-density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 3900-3906
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev*. 1991; 12: 235-251
- Khadilkar V, Ekbote V, Kajale N, Khadilkar A, Chiplonkar S, Kinare A. Effect of one-year growth hormone therapy on body composition and cardio-metabolic risk in Indian children with growth hormone deficiency. *Endocr Rev*. 2014; 39: 73-78
- “Figura 1: Adquisición independiente de datos SWATH-MS y análisis OpenSWATH. (a) El método DIA que se emplea aquí consiste en la adquisición secuencial de espectros de iones fragmento con ventanas solapantes de extracción de precursores. Aquí se muestra una ventana *swath* de 25 *m/z* que permite realizar pasos a través de un rango de masa de 400–

1,200 m/z en 32 pasos individuales. Si todos los iones fragmento de la misma ventana de extracción se alinean, se obtiene un mapa MS2 (denominado 'swath'. En el lado derecho se muestra esquemáticamente el swath 4 de 32). Figura adaptada a partir de la referencia 16. (b) Se ilustran los pasos individuales realizados por el software OpenSWATH para un precursor de péptidos de tres transiciones: rojo, verde, y azul. Los pasos son conversión de datos, alineación del tiempo de retención, extracción cromatográfica, puntuación del grupo pico, y el análisis estadístico para calcular un FDR (tasa de falsos descubrimientos). Consultar el texto principal para hallar una explicación más detallada del flujo de trabajo."Kiemer L, Cesareni G. Comparative interactomics: comparing apples and pears?.Trends Biotechnol. 2007; 25: 448-454

Kobayashi S, Kore-eda S, Tanaka T. Demonstration of the pathogenic effect of point mutated keratin 9 in vivo. FEBS Lett. 1999; 447: 39-43

Kontush A. HDL particle number and size as predictors of cardiovascular disease. Front Pharmacol. 2015; 6: 218

Koshikawa N, Yasumitsu H, Nagashima Y, Umeda M, Miyazaki K. Identification of one- and two-chain forms of trypsinogen 1 produced by a human gastric adenocarcinoma cell line. Biochem J. 1994; 303: 187-190

Kotite L, Zhang LH, Yu Z, Burlingame AL, Havel RJ. Human apoC-IV: isolation, characterization, and immunochemical quantification in plasma and plasma lipoproteins. J Lipid Res. 2003; 44: 1387-1394

Kovanen PT, Bilheimer DW, Goldstein JL, Jaramillo JJ, Brown MS. Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors in vivo in the dog. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981; 78: 1194-1198

Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B et al. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. J Biol Chem. 2000; 275: 20374-20381

Krishnamurthy D, Rahmoune H, Guest PC. Mass Spectrometry Profiling of Pituitary Glands. Methods Mol Biol. 2018; 1735: 439-447

Kubo T, Furujo M, Takahashi K, Hyodo Y, Tsuchiya H, Hattori M et al. Effects of Growth Hormone Treatment on Lipid Profiles. Indian J Pediatr. 2018; 85: 261-265

Kumar PA, Brosius FC 3rd, Menon RK. The glomerular podocyte as a target of growth hormone action: implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy. Curr Diabetes Rev. 2011; 7: 50-55

- Kume N, Kita T, Mikami A, Yokode M, Ishii K, Nagano Y et al. Induction of mRNA for low-density lipoprotein receptors in heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits treated with CS-514 (Pravastatin) and cholestyramine. *Circulation*. 1989; 79: 1084-1090
- Kuromaru R, Kohno H, Ueyama N, Hassan HM, Honda S, Hara T. Long-term prospective study of body composition and lipid profiles during and after growth hormone (GH) treatment in children with GH deficiency: gender-specific metabolic effects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 3890-3896
- Kuzma M, Payer J. [Growth hormone deficiency, its influence on bone mineral density and risk of osteoporotic fractures]. *Cas Lek Cesk*. 2010; 149: 211-216
- Kvasnicka J, Marek J, Kvasnicka T, Weiss V, Marková M, Stěpán J et al. Increase of adhesion molecules, fibrinogen, type-1 plasminogen activator inhibitor and orosomucoid in growth hormone (GH) deficient adults and their modulation by recombinant human GH replacement. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 52: 543-548
- Kyriakakis N, Lynch J, Ajjan R, Murray RD. The effects of pituitary and thyroid disorders on haemostasis: potential clinical implications. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016; 84: 473-484
- Gunczler P, Lopez E, Esaa S, Villaroel O, Revel-Chion R. Cardiac mass and function, carotid artery intima-media thickness, and lipoprotein levels in growth hormone-deficient adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 1061-1065
- Lanes R, Paoli M, Carrillo E, Villaroel O, Palacios A. Cardiovascular risk of young growth-hormone-deficient adolescents. Differences in growth-hormone-treated and untreated patients. *Horm Res Paediatr*. 2003; 60: 291-296
- Lanes R, Soros A, Gunczler P, Paoli M, Carrillo E, Villaroel O et al. Growth hormone deficiency, low levels of adiponectin, and unfavorable plasma lipid and lipoproteins. *J Pediatr*. 2006; 149:324-329
- Lanes R. Cardiovascular Risk in Growth Hormone Deficiency. Beneficial Effects of Growth Hormone Replacement Therapy. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2016; 45: 405-418
- Langbein L, Heid HW, Moll I, Franke WW. Molecular characterization of the body site-specific human epidermal cytokeratin 9: cDNA cloning, amino acid sequence, and tissue specificity of gene expression. *Differentiation J*. 1993; 55: 57-71
- Lass N, Reinehr T. Low Treatment Adherence in Pubertal Children Treated with Thyroxin or Growth Hormone. *Horm Res Paediatr*. 2015; 84: 240-247
- Leary JL, Schmidt RL. Quadrupole mass spectrometers: an intuitive look at the math. *J Chem Educ*. 1996; 73:1142-1144

- Lechuga-Sancho A, Lechuga-Campoy JL, del Valle-Núñez J, Rivas-Crespo F. Predicting the growth response of children with idiopathic growth hormone deficiency to one year of recombinant growth hormone treatment: derivation and validation of a useful method. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009; 22: 501-509
- Lee SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63: e364-369
- Leung KC, Doyle N, Ballesteros M, Waters MJ, Ho KK. Insulin regulation of human hepatic growth hormone receptors: divergent effects on biosynthesis and surface translocation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 4712-4720
- Li Q, Fan P, Bai H, Liu R, Huang Y, Wang X et al. Distribution and effect of apoL-I genotype on plasma lipid and apolipoprotein levels in Chinese normal lipidemic and endogenous hypertriglyceridemic subjects. *Clin Chim Acta.* 2009; 403: 152-155
- Liang S, Xue J, Li G. Effects of recombinant human growth hormone administration on cardiovascular risk factors in obese children with relative growth hormone deficiency. *Lipids Health Dis.* 2018; 17: 66
- Lindsey RC, Mohan S. Skeletal effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I therapy. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 432: 44-55
- Liu M, Doi T, Shen L, Woods SC, Seeley RJ, Zheng S et al. Intestinal satiety protein apolipoprotein AIV is synthesized and regulated in rat hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 280: R1382-1387
- Liu Y, Hüttenhain R, Collins B, Aebersold R. Mass spectrometric protein maps for biomarker discovery and clinical research. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013; 13: 811-825
- Lo AC, Howard AF, Nichol A, Hasan H, Martin M, Heran M et al. A Cross-Sectional Cohort Study of Cerebrovascular Disease and Late Effects after Radiation Therapy for Craniopharyngioma. *Pediatr Blood Cancer.* 2016; 63: 786–793
- Loche S, Salerno M, Garofalo P, Cardinale GM, Licenziati MR, Citro G et al. Adherence in children with growth hormone deficiency treated with r-hGH and the easypod™ device. *J Endocrinol Invest.* 2016; 39: 1419-1424
- López-Siguero JP, López-Canti LF, Espino R, Caro E, Fernández-García JM, Gutiérrez-Macías A et al. Effect of recombinant growth hormone on leptin, adiponectin, resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor- α and ghrelin levels in growth hormone-deficient children. *J Endocrinol Invest.* 2011; 34: 300-306

- Mahesh S, Kaskel F. Growth hormone axis in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23: 41–48
- Marin G, Domené HM, Barnes KM, Blackwell BJ, Cassorla FG, Cutler GB Jr. The effects of estrogen priming and puberty on the growth hormone response to standardized treadmill exercise and arginine-insulin in normal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 537-541
- Martinez VG, Escoda-Ferran C, Tadeu Simões I, Arai S, Orta Mascaró M, Carreras E et al. The macrophage soluble receptor AIM/Ap16/CD5L displays a broad pathogen recognition spectrum and is involved in early response to microbial aggression. *Cell Mol Immunol.* 2014; 11: 343-354
- Martinez-Maqueda D, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Miralles B, Gómez-Ruiz JA. Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. *Proteomics Foods.* 2012; 2: 21-50
- Mauras N. GH use in the transition of adolescence to adulthood. *Endocr Dev.* 2010; 18: 109-125
- McLafferty FW, Breuker K, Jin M, Han X, Infusini G, Jiang H et al. Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS J.* 2007; 274: 6256-6268
- Meazza C, Elsedfy HH, Pagani S, Bozzola E, El Kholy M, Bozzola M. Metabolic parameters and adipokine profile in growth hormone deficient (GHD) children before and after 12-month GH treatment. *Horm Metab Res.* 2014; 46:219-223
- Meazza C, Gertosio C, Pagani S, Pilotta A, Tinelli C, Buzi F et al. Is retesting in growth hormone deficient children really useful? *Minerva Endocrinol.* 2017; 42: 325-330
- Meinhardt UJ, Ho KK. Modulation of growth hormone action by sex steroids. *Clinical Endocrinology (Oxford).* 2006; 65: 413–422
- Meredith PA. Potential concerns about generic substitution: bioequivalence versus therapeutic equivalence of different amlodipine salt forms. *Curr Med Res Opin.* 2009; 25: 2179-2189
- Messias de Lima CF, Dos Santos Reis MD, da Silva Ramos FW, Ayres-Martins S, Smaniotto S. Growth hormone modulates in vitro endothelial cell migration and formation of capillary-like structures. *Cell Biol Int.* 2017; 41: 577-584
- Metwalley KA, Farghaly HS, Abd El-Hafeez HA. Evaluation of left ventricular mass and function, lipid profile, and insulin resistance in Egyptian children with growth hormone deficiency: A single-center prospective case-control study. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013; 17: 876-882

- Meyerhoff N, Haffner D, Staude H, Wühl E, Marx M, Beetz R et al. Effects of growth hormone treatment on adult height in severely short children with X-linked hypophosphatemic rickets. *Pediatr Nephrol*. 2018; 33: 447-456
- Migliaretti G, Ditaranto S, Guiot C, Vannelli S, Matarazzo P, Cappello N et al. Long-term response to recombinant human growth hormone treatment: a new predictive mathematical method. *J Endocrinol Invest*. 2018. doi: 10.1007/s40618-017-0816-6. [Epub ahead of print]
- Minden JS, Dowd SR, Meyer HE, Stühler K. Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2009; Suppl 1:S156-S161
- Mohan, S, Kesavan C. Role of insulin-like growth factor-1 in the regulation of skeletal growth. *Curr Osteoporos Rep*. 2012; 10: 178-186
- Mohseni S, Heydari Z, Qorbani M, Radfar M. Adherence to growth hormone therapy in children and its potential barriers. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018; 31:13-20
- Mora S, Glynn RJ, Ridker PM. High-density lipoprotein cholesterol, size, particle number, and residual vascular risk after potent statin therapy. *Circulation*. 2013; 128: 1189-1197
- Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA. Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem*. 1998; 273: 26194-26201
- Motta G, Allasia S, Ghigo E, Lanfranco F. Ghrelin Actions on Somatotropic and Gonadotropic Function in Humans. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016; 138: 3-25
- Müller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev*. 1999; 79: 511-607
- Murray PG, Clayton PE. Endocrine control of growth. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013; 163C: 76-85
- Murray PG, Dattani MT, Clayton PE. Controversies in the diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence. *Arch Dis Child*. 2016; 101: 96-100
- Murray PG, Higham CE, Clayton PE. 60 Years of Neuroendocrinology: The hypothalamo-GH axis: the past 60 years. *J Endocrinol*. 2015; 226: T123-T140
- Plant TM. 60 Years of Neuroendocrinology: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Endocrinol*. 2015; 226: T41-54
- Nagasaka H, Hirayama S, Takuwa M, Nakacho M, Yorifuji T, Kondou H et al. ApoE4 Determines the Reduction in LDL-C After GH Replacement Therapy in Children With an Idiopathic GH Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:3494-3501

- Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC et al. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 2853-2863
- Nicholls AR, Holt RI. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-1. *Front Horm Res.* 2016; 47: 101-114
- Nielsen J, Jensen RB, Afdeling AJ. [Growth hormone deficiency in children]. *Ugeskr Laeger.* 2015; 177: 1260-1263
- Novo Nordisk. Norditropin® SimpleXx® (somatropin (rDNA origin) for injection). Summary of Product Characteristics. Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, 2015
- Nygren A, Sunnegårdh J, Teien D, Jonzon A, Björkhem G, Lindell S et al. Rapid cardiovascular effects of growth hormone treatment in short prepubertal children: impact of treatment duration. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012; 77: 877-884
- Ogilvy-Stuart AL, Gleeson H. Cancer risk following growth hormone use in childhood: implications for current practice. *Drug Saf.* 2004; 27: 369-382
- Okajima K, Harada N. Promotion of insulin-like growth factor-I production by sensory neuron stimulation; molecular mechanism(s) and therapeutic implications. *Curr Med Chem.* 2008; 15: 3095-3112
- Olarescu NC, Bollerslev J. The Impact of Adipose Tissue on Insulin Resistance in Acromegaly. *Trends Endocrinol Metab.* 2016; 27: 226-237
- Onder A, Aycan Z, Koca C, Ergin M, Cetinkaya S, Agladioglu SY et al. Evaluation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in children with growth hormone deficiency. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2014; 6: 22-27
- Ortea I, Rodríguez-Ariza A, Chicano-Gálvez E, Arenas Vacas MS, Jurado Gámez B. Discovery of potential protein biomarkers of lung adenocarcinoma in bronchoalveolar lavage fluid by SWATH MS data-independent acquisition and targeted data extraction. *J Proteomics.* 2016; 138: 106-114
- Oświęcimska J, Roczniak W, Mikołajczak A, Szymłak A. Growth hormone deficiency in children and young adults. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2016; 70: 928-937
- Pagani S, Meazza C, Travaglini P, Moretta A, Bozzola M. Effect of growth hormone therapy on the proinflammatory cytokine profile in growth hormone-deficient children. *Eur Cytokine Netw.* 2005; 16: 65-69

- Panchaud A, Affolter M, Moreillon P, Kussmann M. Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. *J Proteomics*. 2008; 71: 19-33
- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000; 405: 837-846
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol*. 1993; 3: 327-332
- Paredes SD, Forman KA, García C, Vara E, Escames G, Tresguerres JA. Protective actions of melatonin and growth hormone on the aged cardiovascular system *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014; 18: 79-88
- Partyka M, Chałas R, Dunin-Wilczyńska I, Drohomyska M, Klatka M. Influence of growth hormone therapy on selected dental and skeletal system parameters. *Ann Agric Environ Med*. 2018; 25: 60-65
- Patterson BC, Chen Y, Sklar CA, Neglia J, Yasui Y, Mertens A et al. Growth hormone exposure as a risk factor for the development of subsequent neoplasms of the central nervous system: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99: 2030–2037
- Pereira-Gurgel VM, Faro AC, Salvatori R, Chagas TA, Carvalho-Junior JF, Oliveira CR et al. Abnormal vascular and neural retinal morphology in congenital lifetime isolated growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res*. 2016; 30-31: 11-15
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999; 20: 3551-3567
- Peterkova V, Arslanoglu I, Bolshova-Zubkovskaya E, Romer T, Zdravkovic D, Kratzsch J et al. A randomized, double-blind study to assess the efficacy and safety of valtropin, a biosimilar growth hormone, in children with growth hormone deficiency. *Horm Res*. 2007; 68: 288-293
- Peterkova V, Savoy C, Bezlepina O, Ivanov A, Orlova E, Nagaeva E et al. Efficacy and safety of ValtropinTM in the treatment of short stature in girls with Turner's syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004; 17: 1429-1434
- Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A, de Gaetano G, Walz A, Cerletti C. Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost*. 1996. 76: 780-785
- Pilgeram L. Control of fibrinogen biosynthesis: role of the FFA/albumin ratio. *Cardiovasc Eng*. 2010; 10: 78-83

- Poher AL, Tschöp MH, Müller TD. Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*. 2018; 100: 236-242
- Pokrywka A, Kaliszewski P, Majorczyk E, Zembroń-Łacny A. Genes in sport and doping. *Biol Sport*. 2013; 30: 155-161
- Polak M, Konrad D, Tønnes Pedersen B, Puras G, Šnajderová M. Still too little, too late? Ten years of growth hormone therapy baseline data from the NordiNet® International Outcome Study. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018; 31: 521-532
- Polanski M, Anderson NL. A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomark Insights*. 2007; 7; 1:1-48
- Pombo M, Castro-Feijóo L. Déficit de hormona de crecimiento en la infancia: Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento. In: Diéguez C, Yturriaga R. *Crecimiento*, 2ª ed. Madrid. Interamericana-McGraw-Hill. 2005: 143-170
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010; 28: 1057–1068
- Powers M. GABA supplementation and growth hormone response. *Med Sport Sci*. 2012; 59: 36-46
- Poyrazoğlu Ş, Akçay T, Arslanoğlu İ, Atabek ME, Atay Z, Berberoğlu M et al. Current practice in diagnosis and treatment of growth hormone deficiency in childhood: a survey from Turkey. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2015; 7: 37-44
- Pundir S, Martin MJ, O'Donovan C. UniProt Protein Knowledgebase. *Methods Mol Biol*. 2017; 1558: 41-55.
- Purandare A, Co Ng L, Godil M, Ahnn SH, Wilson TA. Effect of hypothyroidism and its treatment on the IGF system in infants and children. *J Pediatr Endocrinol Metabol*. 2003; 16: 35–42
- Ramistella V, Wasniewska M, Arasi S, Catena M, Velletri MR, Corica D et al. Cross-sectional and prospective study of the effects of GH therapy on metabolic panel in children with GH deficiency. *Pediatr Med Chir*. 2014; 36: 104
- Randeva HS, Lewandowski KC, Komorowski J, Murray RD, O'Callaghan CJ, Hillhouse EW et al. Growth hormone replacement decreases plasma levels of matrix metalloproteinases (2 and 9) and vascular endothelial growth factor in growth hormone-deficient individuals. *Circulation*. 2004; 109: 2405–2410
- Ranke MB. New preparations comprising recombinant human growth hormone: deliberations on the issue of biosimilars. *Horm Res*. 2008; 69: 22-28

- Richard C L, Subburaman M. Skeletal effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 1-12
- Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*. 2006; 24: 971-983
- Rigamonti AE, Grugni G, Marazzi N, Bini S, Bidlingmaier M, Sartorio A. Unaltered ratio of circulating levels of growth hormone/GH isoforms in adults with Prader-Willi syndrome after GHRH plus arginine administration. *Growth Horm IGF Res*. 2015; 25: 168-173
- Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinf*. 2011; 12: 77
- Rochiocioli P, Tauber M. Growth hormone deficiency: Establishment of the diagnosis by means of growth hormone secretion tests in the Kabi International Growth Study. In: *Progress in Growth Hormone Therapy- 5 years of KIGS*. Ranke MB, Gunnarson RJ: Mannheim. J&J Verlag. 1994: 68-76
- Rogowicz-Frontczak A, Majchrzak A, Zozulińska-Ziółkiewicz D. Insulin resistance in endocrine disorders - treatment options. *Endokrynol Pol*. 2017; 68: 334-351
- Rohrer TR, Horikawa R, Kappelgaard AM. Growth hormone delivery devices: current features and potential for enhanced treatment adherence. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017; 14: 1253-1264
- Roman-Padilla J, Rodríguez-Rúa A, Claros MG, Hachero-Cruzado I, Manchado M. Genomic characterization and expression analysis of four apolipoprotein A-IV paralogs in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2016; 191: 84-98
- Romer T, Peter F, Saenger P, Starzyk J, Koehler B, Korman E et al. Efficacy and safety of a new ready-to-use recombinant human growth hormone solution. *J Endocrinol Invest*. 2007; 30: 578-589
- Rosenfeld RG, Bakker B. Compliance and persistence in pediatric and adult patients receiving growth hormone therapy. *Endocr Pract*. 2008; 14: 143-154
- Rota F, Savanelli MC, Tauchmanova L, Savastano S, Lombardi G, Colao A et al. Bone density and turnover in young adult patients with growth hormone deficiency after 2-year growth hormone replacement according with gender. *J Endocrinol Invest*. 2008; 31: 94-102
- Rothermel J, Reinehr T. Metabolic alterations in paediatric GH deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016; 30: 757-770

- Rudling M, Norstedt G, Olivecrona H, Reihner E, Gustafsson JA, Angelin B. Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:6983-6987
- Russell-Jones DL, Bowes SB, Rees SE, Jacson NC, Weissberger AJ, Hovorke R et al. Effect of growth hormone treatment on postprandial protein metabolism in growth hormone-deficient adults. *Am J Physiol*. 1998; 274: 1050-1056
- Saegusa J, Yamaji S, Ieguchi K, Wu CY, Lam KS, Liu FT et al. The direct binding of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) to integrin $\alpha v \beta 3$ is involved in IGF-1 signaling. *J Biol Chem*. 2009; 284: 24106-24114
- Saenger PH, Mejia-Corletto J. Long-Acting Growth Hormone: An Update. *Endocr Dev*. 2016; 30: 79-97
- Salerno M, Esposito V, Spinelli L, Di Somma C, Farina V, Muzzica S et al. Left ventricular mass and function in children with GH deficiency before and during 12 months GH replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004; 60: 630-636
- Salerno M, Esposito V, Farina V, Radetti G, Umbaldo A, Capalbo D et al. Improvement of cardiac performance and cardiovascular risk factors in children with GH deficiency after two years of GH replacement therapy: an observational, open, prospective, case-control study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 1288-1295
- Sanders EJ, Harvey S. Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor. *Anat Embryol (Berl)*. 2004; 209: 1-9
- Sanders EJ, Parker E, Arámburo C, Harvey S. Retinal growth hormone is an anti-apoptotic factor in embryonic retinal ganglion cell differentiation. *Exp Eye Res*. 2005; 81: 551-560
- Sanders EJ, Parker E, Harvey S. Retinal ganglion cell survival in development: mechanisms of retinal growth hormone action. *Exp Eye Res*. 2006; 83: 1205-1214
- Sanjurjo L, Amézaga N, Aran G, Naranjo-Gómez M, Arias L, Armengol C et al. The human CD5L/AIM-CD36 axis: A novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses. *Autophagy*. 2015; 11: 487-502
- Sanjurjo L, Amézaga N, Vilaplana C, Cáceres N, Marzo E, Valeri M et al. The scavenger protein apoptosis inhibitor of macrophages (AIM) potentiates the antimicrobial response against *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing autophagy. *PLoS One*. 2013; 8: e79670
- Sarrias MR, Roselló S, Sánchez-Barbero F, Sierra JM, Vila J, Yélamos J et al. A role for human Sp α as a pattern recognition receptor. *J Biol Chem*. 2005; 280: 35391-35398

- Schertzer JD, Lynch GS. Comparative evaluation of IGF-I gene transfer and IGF-I protein administration for enhancing skeletal muscle regeneration after injury. *Gene Ther.* 2006; 13: 1657-1664
- Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol.* 2009; 3: 33-44
- Schilbach K, Olsson DS, Boguszewski MCS, Bidlingmaier M, Johannsson G, Jørgensen JL. Biomarkers of GH action in children and adults. *Growth Horm IGF Res.* 2018; 40:1-8. doi: 10.1016/j.ghir.2018.03.005. [Epub ahead of print]
- Seguy D, Darmaun D, Duhamel A, Thuillier F, Cynober L, Cortot A et al. Growth hormone enhances fat-free mass and glutamine availability in patients with short-bowel syndrome: an ancillary double-blind, randomized crossover study. *Am J Clin Nutr.* 2014; 100: 850-858
- Serim S, Haedke U, Verhelst SH. Activity-based probes for the study of proteases: recent advances and developments. *ChemMedChem.* 2012; 7: 1146-1159
- Serri O, St-Jacques P, Sartippour M, Renier G. Alteration of monocyte function in patients with growth hormone (GH) deficiency: effect of substitutive GH therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 58
- Sesnilo G, Biller BM, Llevadot J, Hayden D, Hanson G, Rifai N et al. Effects of growth hormone (GH) administration on homocyst(e)ine levels in men with GH deficiency: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 1518-1524
- Shah A, Stanhope R, Matthew D. Hazards of pharmacological tests of growth hormone secretion in childhood. *BMJ.* 1992; 304: 173-174
- Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M, Portmann T, Shu R, Sebastiano V et al. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature.* 2013; 503: 267-271
- Shen L, Sun CM, Li XT, Liu CJ, Zhou YX. Growth hormone therapy and risk of recurrence/progression in intracranial tumors: a meta-analysis. *Neurol Sci.* 2015; 36: 1859-1867
- Shevchenko A, Wilm M, Mann M. Peptide sequencing by mass spectrometry for homology searches and cloning of genes. *J Protein Chem.* 1997; 16:481-90
- Shi T, Song E, Nie S, Rodland KD, Liu T, Qian WJ et al. Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research. *Proteomics.* 2016; 16: 2160-2182.
- Shi T, Su D, Liu T, Tang K, Camp DG 2nd, Qian WJ et al. Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics. *Proteomics.* 2012; 12: 1074-1092

- Skerka C, Hellwage J, Weber W, Tilkorn A, Buck F, Marti T et al. The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem.* 1997; 272: 5627-5634
- Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Occhiogrosso G, Qin J, Heller G et al. Risk of disease recurrence and second neoplasms in survivors of childhood cancer treated with growth hormone: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 3136–3141
- Smyczynska J, Hilczer M, Stawerska R, Lewinski A. Significant increase of IGF-I concentration and of IGF-I/IGFBP-3 molar ratio in generation test predicts the good response to growth hormone (GH) therapy in children with short stature and normal results of GH stimulating tests. *Neuro Endocrinol Lett.* 2013; 34: 222-228
- Soliman A, Adel A, Sabt A, Elbukhari E, Ahmed H, De Sanctis V. Does priming with sex steroids improve the diagnosis of normal growth hormone secretion in short children?. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014; 18: S80-S83
- Sonksen PH. Insulin, growth hormone and sport. *J Endocrinol.* 2001; 170: 13-25
- Sonntag J, Bender C, Soons Z, von der Heyde S, König R, Wiemann S et al. Reverse phase protein array based tumor profiling identifies a biomarker signature for risk classification of hormone receptor-positive breast cancer. *Transl. Proteomics.* 2014; 2: 52-59
- Sperling MA. Traditional and novel aspects of the metabolic actions of growth hormone. *Growth Horm IGF Res.* 2016; 28: 69-75
- Spiliotis BE, August GP, Hung W, Sonis W, Mendelson W, Bercu BB. Growth hormone neurosecretory dysfunction. A treatable cause of short stature. *JAMA.* 1984; 251: 2223-2230
- Spoudeas HA, Bajaj P, Sommerford N. Maintaining persistence and adherence with subcutaneous growth-hormone therapy in children: comparing jet-delivery and needle-based devices. *Patient Prefer Adherence.* 2014; 8: 1255-1263
- States DJ, Omenn GS, Blackwell TW, Fermin D, Eng J, Speicher DW et al. Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. *Nat Biotechnol.* 2006; 24: 333-338
- Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 699-711
- Stewart C, Garcia-Filion P, Fink C, Ryabets-Lienhard A, Geffner ME, Borchert M. Efficacy of growth hormone replacement on anthropometric outcomes, obesity, and lipids in children with optic nerve hypoplasia and growth hormone deficiency. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2016; 2016: 5

- Steyn FJ, Tolle V, Chen C, Epelbaum J. Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. *Compr Physiol*. 2016; 6: 687-735
- Steyn FJ. Nutrient Sensing Overrides Somatostatin and Growth Hormone-Releasing Hormone to Control Pulsatile Growth Hormone Release. *J Neuroendocrinol*. 2015; 27: 577-587
- Stochholm K, Kiess W. Long-term safety of growth hormone-A combined registry analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018; 88: 515-528
- Storey JD, Bass AJ, Dabney A, Robinson D, qvalue: Q-value Estimation for False Discovery Rate Control. R Package Version 2.10.0, <http://github.com/jdstorey/qvalue>, (2015)
- Such-Sanmartín G, Bache N, Bosch J, Gutiérrez-Gallego R, Segura J, Jensen ON. Detection and differentiation of 22 kDa and 20 kDa Growth Hormone proteoforms in human plasma by LC-MS/MS. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1854: 284-290
- Sundralingam T, Tennekoon KH, de Silva S, De Silva S, Hewage AS. Pathogenic and likely pathogenic genetic alterations and polymorphisms in growth hormone gene (GH1) and growth hormone releasing hormone receptor gene (GHRHR) in a cohort of isolated growth hormone deficient (IGHD) children in Sri Lanka. *Growth Horm IGF Res*. 2017; 36: 22-29
- Suravajhala P, Kogelman LJ, Kadarmideen HN. Multi-omic data integration and analysis using systems genomics approaches: methods and applications in animal production, health and welfare. *Genet Sel Evol*. 2016; 48: 38
- Surinova S, Schiess R, Hüttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the Development of Plasma Protein Biomarkers. *J Proteome Rev*. 2011; 10: 5-16
- Swerdlow AJ, Higgins CD, Adlard P, Preece MA. Risk of cancer in patients treated with human pituitary growth hormone in the UK, 1959-85: a cohort study. *Lancet*. 2002; 360: 273-277
- Swerdlow AJ, Reddingius RE, Higgins CD, Spoudeas HA, Phipps K, Qiao Z et al. Growth hormone treatment of children with brain tumors and risk of tumor recurrence. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 4444-4449
- Szalecki M, Malinowska A, Prokop-Piotrkowska M, Janas R. Interactions between the growth hormone and cytokines - A review. *Adv Med Sci*. 2018; 63: 285-289
- Szkudlarek J, Jeppesen PB, Mortensen PB. Effect of high dose growth hormone with glutamine and no change in diet on intestinal absorption in short bowel patients: a randomised, double blind, crossover, placebo controlled study. *Gut*. 2000; 47: 199-205
- Szynaka E, Petriczko E, Grabarek J, Miklaszewicz A, Domagala W, Walczak M. Effects of recombinant human growth hormone (rhGH) replacement therapy on detailed immunologic

- parameters in somatotropine--deficient paediatrics patients prior and after 6 months of rhGH treatment. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010;31:553-558
- Takeda A, Cooper K, Bird A, Baxter L, Frampton GK, Gospodarevskaya E et al. Recombinant human growth hormone for the treatment of growth disorders in children: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2010; 14: 1-209,
- Tan KC, Shiu SW, Janus ED, Lam KS. LDL subfractions in acromegaly: relation to growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Atherosclerosis.* 1997; 129: 59-65
- Tao R, Acquati F, Marcovina SM, Hobbs HH. Human growth hormone increases apo(a) expression in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2439-2447
- Tarca AL, Draghici S, Khatri P, Hassan SS, Mittal P, Kim JS et al. A novel signaling pathway impact analysis. *Bioinformatics.* 2009; 25: 75-82
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: D158-D169. 29
- Thevis M, Bredehöft M, Kohler M, Schänzer W. Mass spectrometry-based analysis of IGF-1 and hGH. *Handb Exp Pharmacol.* 2010; 195: 201-207
- Thum T, Fleissner F, Klink I, Tsikas D, Stichtenoth D, Ertl G et al. Growth hormone treatment improves markers of systemic nitric oxide bioavailability via the insulin-like growth factor-1 Importance for endothelial progenitor cells. *J Stem Cells Regen Med.* 2007; 2: 115-116
- Thum T, Hoeber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res.* 2007; 100: 434-443
- Tóke J, Bertalan R, Gergics P, Halász Z. Genetic factors in hypopituitarism. The role of transcription factors in pituitary hormone deficiency. *Orv Hetil.* 2018; 159: 278-284
- Tokudome T, Otani K, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin and the heart. *Peptides.* 2018. pii: S0196-9781(18)30104-9. doi: 10.1016/j.peptides.2018.05.006. [Epub ahead of print]
- Tritos NA, Klibanski A. Effects of Growth Hormone on Bone. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2016; 138: 193-211
- Tso P, Sun W, Liu M. Gastrointestinal satiety signals IV. Apolipoprotein A-IV. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286: G885-G890

- Uronen-Hansson H, Allen ML, Lichtarowicz-Krynska E, Aynsley-Green A, Cole TJ, Hoiden-Guthenberg I et al. Growth hormone enhances proinflammatory cytokine production by monocytes in whole blood. *Growth Horm IGF Res.* 2003; 13: 282
- Van der Klaauw AA, Pereira AM, Rabelink TJ, Corssmit EP, Zonneveld AJ, Pijl H et al. Recombinant human GH replacement increases CD34+ cells and improves endothelial function in adults with GH deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2008; 159: 105-111
- Van Doorn J, Ringeling AM, Shmueli SS, Kuijpers MC, Hokken-Koelega AC, van Buul-Offers SC et al. Circulating levels of human insulin-like growth factor binding protein-6 (IGFBP-6) in health and disease as determined by radioimmunoassay. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999; 50: 601-609
- Van Vlijmen B, van Gool L, Repping-Wuts H, Ketels T, Kerstens M, Burger D et al. [Successful switch from originator to biosimilar growth hormone: patients' experiences]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2017; 161: D1415
- Vankelecom H, Chen J. Pituitary stem cells: where do we stand?. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 385:2-17
- Vankelecom H. Pituitary stem cells drop their mask. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012; 7: 36-71
- Vijayakumar A, Novosyadlyy R, Wu Y, Yakar S, LeRoith D. Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Horm IGF Res.* 2010; 20:1-7
- Vosahlo J, Zidek T, Lebl J, Riedl S, Frisch H. Validation of a mathematical model predicting the response to growth hormone treatment in prepubertal children with idiopathic growth hormone deficiency. *Horm Res.* 2004; 61: 143-147
- Vowinckel J, Capuano F, Campbell K, Deery MJ, Lilley KS, Ralser M. The beauty of being (label)-free: sample preparation methods for SWATH-MS and next-generation targeted proteomics. *Version 2. F1000Res.* 2013 [revised 2014]; 2:272. eCollection 2013
- Vyas V, Kumar A, Jain V. Growth Hormone Deficiency in Children: From Suspecting to Diagnosing. *Indian Pediatr.* 2017; 54: 955-960
- WADA 2008. The World Anti-Doping Code: The 2008 Prohibited List international Standard 2009. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2009_EN.pdf
- Wada guidelines, Human Growth Hormone (hGH) BIOMARKERS TEST for Doping Control Analyses Version 2.0, 2016 (Accessed 20 April 2016) <https://www.wadaama.org/en/resources/laboratories/guidelines-human-growth-hormone-hgh-biomarkers-test>

- WADA, GUIDELINES: hGH ISOFORM DIFFERENTIAL IMMUNOASSAYS for Anti-Doping Analyses Version 2.1, 2014 (Accessed 20 April 2016) <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/guidelines-detection-of-doping-with-hgh>
- Wagner IV, Paetzold C, Gausche R, Vogel M, Koerner A, Thiery J et al. Clinical evidence-based cut off limits for GH stimulation tests in children with a backup of results with reference to mass spectrometry. *Eur J Endocrinol.* 2014; 171: 389–397
- Wales PW, Nasr A, de Silva N, Yamada J. Human growth hormone and glutamine for patients with short bowel syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 16: CD006321
- Wang F, Kohan AB, Kindel TL, Corbin KL, Nunemaker CS, Obici S et al. Apolipoprotein A-IV improves glucose homeostasis by enhancing insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 9641-9646
- Wang F, Kohan AB, Lo CM, Liu M, Howles P, Tso P. Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *J Lipid Res.* 2015; 56: 1403-1418
- Wang X, Driscoll DM, Morton RE. Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F. *J Biol Chem.* 1999; 274: 1814-1820
- Waters MJ. The growth hormone receptor. *Growth Horm IGF Res.* 2016; 28:6-10
- Watson, J D, Crick, F H C. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953; 171, 737–738
- Weickhardt C, Moritz F, Grotemeyer J. Time-of-flight mass spectrometry: State-of the-art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrom Rev.* 1996; 15: 139-162.
- Williamson RC. Intestinal adaptation (first of two parts): structural, functional and cytokinetic changes. *N Engl J Med.* 1978; 298: 1393–1402
- Wheelock CE, Goss VM, Balgoma D, Nicholas B, Brandsma J, Skipp PJ et al. Application of omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *Eur Resp J.* 2013; 42: 802–825
- Wilton P, Mattsson AF, Darendeliler F. Growth hormone treatment in children is not associated with an increase in the incidence of cancer: experience from KIGS (Pfizer International Growth Database). *J Pediatr.* 2010; 157: 265–270
- Witkowska-Sędek E, Labochka D, Majcher A, Pyrzak B. The pre-treatment characteristics and evaluation of the effects of recombinant human growth hormone therapy in children with growth hormone deficiency and celiac disease or inflammatory bowel disease. *Cent Eur J Immunol.* 2018; 43: 69-75

- Wong KS, Chan GH, Ho EN, Wan TS. Simultaneous detection of recombinant growth hormones in equine plasma by liquid chromatography/high-resolution tandem mass spectrometry for doping control. *J Chromatogr A*. 2016. pii: S0021-9673(16)31544-8.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*. 1998; 280: 1378-1383
- Wu S, Yang W, De Luca F. Insulin-like growth factor-independent effects of growth hormone on growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth. *Endocrinology*. 2015; 156: 2541-2551
- Xue Y, Gao Y, Wang S, Wang P. An examination of the effects of different doses of recombinant human growth hormone on children with growth hormone deficiency. *Exp Ther Med*. 2016; 11: 1647-1652
- Yakar S, Werner H, Rosen CJ. Insulin-like growth factors: actions on the skeleton. *J Mol Endocrinol*. 2018; 61: T115-T137
- Yoo EJ, Brown CD, Tsai YC, Cooke NE, Liebhaber SA. Autonomous actions of the human growth hormone long-range enhancer. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: 2091-2101
- Yuen KCJ, Miller BS, Biller BMK. The current state of long-acting growth hormone preparations for growth hormone therapy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2018. doi: 10.1097/MED.0000000000000416. [Epub ahead of print]
- Yukizane S, Kimura Y, Yamashita Y, Matsuishi T, Horikawa H, Ando H et al. Growth hormone deficiency of hypothalamic origin in septo-optic dysplasia. *Eur J Pediatr*. 1990; 150: 30-33
- Zhang L, Xiao H, Zhou H, Santiago S, Lee JM, Garon EB et al. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cel Mol Life Sci*. 2012; 69: 3341–3350
- Zhang Y, Bilbao A, Bruderer T, Luban J, Strambio-De-Castillia C, Lisacek F et al. The Use of Variable Q1 Isolation Windows Improves Selectivity in LC-SWATH-MS Acquisition. *J Proteome Res*. 2015; 14: 4359-4371
- Zhao Y, Jensen ON. Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics*. 2009; 9: 4632-4641
- Zhao Y, Xiao Z, Frank SJ, Lin HY, Xia Y. Distinct mechanisms of induction of hepatic growth hormone resistance by endogenous IL-6, TNF- α , and IL-1s. *Am J Physiol Endocrinol Metabol*. 2014; 307: E186–E198

Ziaei M, Tennant M, Sanders EJ, Harvey S. Vitreous growth hormone and visual dysfunction. *Neurosci Lett.* 2009; 460: 87-91

Zoidis E, Ghirlanda-Keller C, Schmid C. Stimulation of glucose transport in osteoblastic cells by parathyroid hormone and insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biochem.* 2011; 348: 33-42

9. RESUMEN

Aunque la manifestación clínica típica del déficit de la hormona del crecimiento (DGH) en el niño, es una baja estatura resultante de un retraso en el crecimiento, también se puede afectar y promover la acumulación de factores de riesgo cardiovascular, teniendo consecuencias metabólicas tales como la acumulación de grasa visceral, alteración del perfil lipídico y pérdida de densidad mineral ósea (DMO), pudiendo aumentar el riesgo de fracturas y enfermedades cardiovasculares en la edad adulta.

Actualmente no se dispone de ningún parámetro bioquímico (biomarcador) para el diagnóstico fiable en niños con DGH, existiendo una necesidad en la identificación de biomarcadores.

Nuestro trabajo se ha proyectado sobre 15 niños prepúberes con DGH y 15 niños prepúberes sanos (controles), en los cuales la abundancia relativa de las proteínas séricas se midió mediante una técnica de proteómica de reciente generación, tecnología SWATH-MS.

Los datos generados fueron analizados mediante algoritmos de selección para identificar aquellas proteínas que mejor discriminan entre ambos grupos. Se detectaron y cuantificaron un total de 263 proteínas. Se identificaron 121 proteínas diferenciales entre niños con DGH versus controles sanos.

Las rutas metabólicas y los grupos de proteínas más afectados estaban relacionados con la proliferación y motilidad celular, transporte entre células y desarrollo tisular. Se aplicaron algoritmos de selección de biomarcadores y en función del rendimiento de separación de las muestras entre DGH y controles sanos, se encontró que, la combinación de tres proteínas, la apolipoproteína A-IV (APOA4), proteína 4 relacionada con el factor H del complemento (FHR4) y la proteína básica de las plaquetas (CXCL7), mostró la mejor sensibilidad y especificidad para clasificar los individuos en sanos y enfermos. Además, el grupo de apolipoproteínas de alta densidad apareció sobreexpresado, pudiendo formar un panel biomarcador prometedor en el diagnóstico del DGH, así como en la evaluación del tratamiento.

Con el tratamiento a corto plazo con GH (6 meses) en el niño prepúber con DGH se registró un cambio en 39 proteínas. En veintinueve de estas, el tratamiento revirtió el efecto de la enfermedad. Ocho pertenecientes al metabolismo de las lipoproteínas, 7 relacionadas con la coagulación y homeostasis y 4 con la mineralización y formación de hueso.

La secreción pulsátil de la GH y diversos factores que influyen en la variación de su concentración hacen necesario el uso de pruebas de estimulación de la GH para su diagnóstico. Sin

embargo, estos test presentan gran variabilidad intra-individual y una pobre reproducibilidad. Aunque la IGF-1 no está influenciada por la fluctuación diurna o por factores como la ingesta de comida, ejercicio o estrés, tiene una baja sensibilidad (aunque alta especificidad) como biomarcador diagnóstico. Su principal inconveniente es que los niveles circulantes de esta corresponden principalmente a la producción de IGF-1 hepática (y no a la local). Además, los cambios de concentración de IGF-1 en suero durante el tratamiento con GH se correlacionan pobremente con la consecución de los objetivos clínicos.

Esto hace necesario, la identificación de nuevos biomarcadores tanto para el diagnóstico del déficit como para medir la actividad del tratamiento con GH. En el diagnóstico del DGH en el niño prepúber, la espectrometría de masas ofrece un futuro prometedor, abriendo una línea de investigación a más largo plazo.

SUMMARY

Although the typical clinical manifestation of growth hormone deficiency (GHD) is short stature as a result of growth delay, it can also affect and promote the accumulation of cardiovascular risk factors leading to such metabolic consequences as visceral fat accumulation, alteration in lipid profile and loss of bone mineral density (BMD) increasing the risk of fractures and cardiovascular diseases in adulthood.

Currently, there is no biochemical parameter (biomarker) for a reliable diagnosis for children with GHD, and there is a need for identification of biomarkers.

Our work has been performed on 15 healthy prepuberal children with GHD (control) in whom the relative abundance of serum proteins was measured through a proteomic technique of the latest generation, SWATH-MS technology.

The generated data were analyzed by selection algorithms to identify those proteins that best differentiate between both groups. 263 proteins were detected and quantified in total. 121 differential proteins were identified among children with GHD versus healthy controls.

The most affected metabolic routes and protein groups were associated with cell proliferation and motility, transportation between cells, and tissue development. Biomarker selection algorithms were applied and, based on the separation performance of samples between GHD and healthy controls, it was found that the combination of 3 proteins, the apolipoprotein A-IV (APOA4), the complement factor H-related protein 4 (CFHR4) and the pro-platelet basic protein (CXCL7), showed the best sensitivity and specificity to classify between healthy individuals and sick individuals. In addition, the high-density apolipoprotein group came up overexpressed forming a promising biomarker panel in GHD diagnosis as well as in treatment evaluation.

With the short-term GH treatment (6 months) in prepuberal children with GHD, a change in 39 proteins was recorded. In 29 of these, the treatment reverted the disease's effect. Eight belonging to the metabolism of lipoproteins, 7 associated with coagulation and homeostasis, and 4 with bone mineralization and formation.

GH pulsatile secretion and several factors that influence the variation of its concentration create the necessity of using GH stimulation tests for its diagnosis.

However, these tests present great intra-individual variability and poor reproducibility. Although the IGF-1 is not influenced by daytime fluctuation or by such factors as food intake, exercise, or stress, it has low sensitivity (though high specificity) as a diagnostic biomarker. Its main inconvenience is that its circulating levels mainly correspond to hepatic IGF-1 production (and not the local one). In addition, IGF-1 concentration changes in serum during treatment with GH are poorly correlated with the achievement of clinical objectives.

This creates the need to identify new biomarkers for deficiency diagnosis as well as to measure the activity of the treatment with GH. In GHD diagnosis in prepuberal children, mass spectrometry offers a promising future as it opens up a longer-term research line.

10. FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido financiada por las siguientes entidades:

Programa de Pfizer (WI181900) para estudios iniciados por el investigador (IIR por sus siglas en inglés).

Los análisis de espectrometría de masa se llevaron a cabo en la Unidad de Proteómica del IMIBIC, miembro de ProteoRed (Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos), con el apoyo de la subvención PT13/0001 financiada por el Instituto de Salud Carlos III (ISC III) y FEDER.

Conflicto de intereses

Ausencia de conflicto de intereses con otros doctores externos.

11. ANEXOS

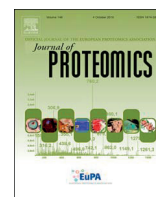
ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS (incluidas en un CD).

- Tabla S1. Lista de 297 proteínas identificadas.
- Tabla S2. Ventanas de extracción en el primer cuadrupolo empleadas en la adquisición SWATH.
- Tabla S3. Valores cuantitativos normalizados de las 263 proteínas cuantificadas en el análisis SWATH de la comparación enfermos DGH basal (DGH t0) vs controles sanos.
- Tabla S4. Valores cuantitativos normalizados de las 274 proteínas cuantificadas en el análisis SWATH de la comparación enfermos DGH tras tratamiento (DGH t6) vs enfermos DGH basal (DGH t0).
- Tabla S5. Cambios en la abundancia de las proteínas cuantificadas, entre enfermos DGH basal (DGH t0) y controles sanos.
- Tabla S6. Cambios en la abundancia de las proteínas cuantificadas, entre enfermos tras tratamiento (DGH t6) y enfermos al diagnóstico (DGH t0).
- Tabla S7. Frecuencia de selección de las proteínas cuantificadas, en función del proceso de *feature selection*.
- Tabla S8. Valores AUC para las proteínas principales y las combinaciones para las dos y tres proteínas entre las seis primeras según lo derivado del proceso de *feature selection*.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Identification of candidate serum biomarkers of childhood-onset growth hormone deficiency using SWATH-MS and feature selection

Ignacio Ortea^{a,*}, Isabel Ruiz-Sánchez^{b,1}, Ramón Cañete^{b,c}, Javier Caballero-Villarraso^d,
María Dolores Cañete^{b,c}

^a Proteomics Unit, IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

^b Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

^c GA-05, IMIBIC, Córdoba, Spain

^d Clinical Analysis Services, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain.



ARTICLE INFO

Keywords:

Growth hormone deficiency
Quantitative proteomics
SWATH
Biomarkers

ABSTRACT

A typical clinical manifestation of growth hormone deficiency (GHD) is a short stature resulting from delayed growth, but GHD affects bone health, cardiovascular function and metabolic profile and therefore quality of life. Although early GH treatment during childhood has been shown to improve outcomes, no single biochemical parameter is currently available for the accurate diagnosis of GHD in children. There is hence a need for non-invasive biomarkers. In this study, the relative abundance of serum proteins from GHD children and healthy controls was measured by next-generation proteomics SWATH-MS technology. The data generated was analysed by machine-learning feature-selection algorithms in order to discover the minimum number of protein biomarkers that best discriminate between both groups. The analysis of serum proteins by a SWATH-MS approach yielded a useful method for discovering potential biomarkers of GHD in children. A total of 263 proteins were confidently detected and quantified in each sample. Pathway analysis indicated an effect on tissue/organ structure and morphogenesis. The top ten serum protein biomarker candidates were identified after applying feature-selection data analysis. The combination of three proteins – apolipoprotein A-IV, complement factor H-related protein 4 and platelet basic protein – demonstrated the best classification performance for our data. In addition, the apolipoprotein group resulted in strong over-representation, thus highlighting these proteins as an additional promising biomarker panel.

Significance: Currently there is no single biochemical parameter available for the accurate diagnosis of growth hormone (GH) deficiency (GHD) in children. Simple GH measurements are not an option: because GH is released in a pulsatile action, its blood levels fluctuate throughout the day and remain nearly undetectable for most of that time. This makes measurements of GH in a single blood sample useless for assessing GH deficiency. Actually, the diagnosis of GHD includes a combination of direct and indirect non-accurate measurements, such as taking several body measurements, testing GH levels in multiple blood samples after provocative tests (GH peak < 7.3 ng/mL, using radioimmunoassay), and conducting magnetic resonance imaging (MRI), among others. Therefore, there is a need for simple, non-invasive, accurate and cost-effective biomarkers. Here we report a case-control study, where relative abundance of serum proteins were measured by next-generation proteomics SWATH-MS technology in 15 GHD children and 15 healthy controls matched by age, sex, and not receiving any treatment. Data generated was analysed by machine learning feature selection algorithms. 263 proteins could be confidently detected and quantified on each sample. The top 10 serum protein biomarker candidates could be identified after applying a feature selection data analysis. The combination of three proteins, apolipoprotein A-IV, complement factor H-related protein 4 and platelet basic protein, showed the best classification performance for our data. In addition, the fact that the pathway and GO analysis we performed pointed to the apolipoproteins as over-represented highlights this protein group as an additional promising biomarker panel for the diagnosis of GHD and for treatment evaluation.

* Corresponding author at: Proteomics Unit, IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Universidad de Córdoba, Av. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain.
E-mail address: ignacio.ortea@imibic.org (I. Ortea).

¹ These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

Growth hormone (GH), a peptide hormone secreted from the anterior pituitary, plays a key role in children's growth phase [1]. The hormone promotes growth by boosting the production of insulin-like growth factor (IGF)-1 in peripheral tissues, including the cartilage and liver. The GH-IGF1 axis stimulates the division and expansion of cartilage tissues and plays a variety of roles in bone, muscle and other body-related metabolic activities, including glucose production, protein anabolism, and fat and bone metabolism [2]. GH promotes a positive protein balance in skeletal muscle, thus increasing the amino acid uptake and the transcription of protein anabolic enzymes; GH also exhibits lipolytic effects by decreasing cholesterol blood levels and maintaining glucose homeostasis with decreased insulin sensitivity.

GH deficiency (GHD), either isolated or in combination with a deficiency of other hormones, is caused either by congenital origins (e.g. idiopathic, genetic and developmental abnormalities) or is acquired (e.g. pituitary or hypothalamic tumours or head trauma) [3]; the condition consists of the partial or total absence of GH detectable in the plasma or serum. This syndrome is defined by a combination of auxological, clinical, biochemical and metabolic abnormalities caused by a lack (or insufficiency) of GH secretion that results in a decrease in the production of GH-dependent hormones and growth factors [4]. The prevalence of congenital childhood-onset GHD has been estimated to be one in 3500–4000 live births [2]. The typical clinical manifestation of GHD is a short stature as a result of delayed growth, but the condition also affects bone health, cardiovascular function and metabolic profile (and therefore quality of life) from childhood and adolescence to young adulthood and beyond [2].

Early GH treatment in childhood has been shown to improve outcomes and to result in better bone-mass indices upon completion of treatment [5]. Early diagnosis of the disease is hence crucial. As of now, however, no single biochemical parameter (nor a combination) is available for accurate, extended and cost-effective use as a GHD marker. Simple GH measurements are not an option: because GH is released in a pulsatile action, its blood levels fluctuate throughout the day and remain nearly undetectable for most of that time. This makes measurements of GH in a single blood sample useless for assessing GH deficiency.

The diagnosis of GHD includes a combination of direct and indirect measurements, such as taking several body measurements, testing GH levels in multiple blood samples after provocative tests (GH peak < 7.3 ng/mL), and conducting magnetic resonance imaging (MRI) to evaluate the size and structure of the pituitary and parasellar regions. In addition, IGF-I and IGFBP3 levels should be determined; any other causes of undergrowth should be excluded [6].

Due to this lack of efficient diagnostic parameters, the need undoubtedly exists to develop accurate systemic non-invasive biomarkers of GHD that could easily be implemented within a clinical analytical assay and used to improve diagnoses. Proteomics, one of the most powerful tools used in biomedical research, is gaining increased importance in the assessment of significant alterations in levels of clinical biomarkers or their expression in various pathological conditions [7, 8]. Studies related to GH-level alterations are scarce, however, and none have been performed to compare GHD-afflicted children with their healthy counterparts in order to discover early GHD biomarkers. Several studies have used proteomic methodologies for the indirect detection of GH abuse among athletes [9–11]. Other studies have been performed to discover biomarkers of GH therapy. Andersson et al. [12] and Decker et al. [13], using surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS), found specific protein-expression patterns associated with changes in longitudinal growth and bone mass (as well as with remodelling of different body compartments) during GH treatment in short-statured prepubertal children. Some of the proteins within these specific profiles were identified as apolipoproteins (amyloid A4 and transthyretin), although

others could not be identified due to instrumental limitations. Using two-dimensional electrophoresis (2-DE), Cruz-Topete et al. [14] found that two serum proteins had been significantly altered three months following GH replacement therapy in adult GHD patients. The authors found that apolipoprotein A-I had increased in post-treatment samples, whereas haptoglobin levels had decreased. Heo et al. [15], also using 2-DE, found increased levels of serum apolipoproteins apo E and apo L-1 following three-month GH therapy in idiopathic short-statured children. Most of these studies thus suggest that GH therapy influences lipoprotein metabolism.

In our opinion, new advances in mass spectrometry (MS) based proteomics that combine developments in instrumentation, sample preparation and computational analysis could help to fill the gap in the development of non-invasive and easy-to-implement GH-deficiency biomarkers. One of the most recent developments in MS-based quantitative proteomics – generally termed ‘next-generation proteomics’ to reflect the ability to characterise almost complete proteomes [16], thus mirroring the comprehensive coverage of DNA and RNA species by next-generation nucleic-acid-sequencing methods – is the ‘sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra’ (SWATH) approach [17]. SWATH allows for routine and high-throughput quantification of up to thousands of proteins per sample; the approach does so reproducibly and with a high level of data completeness. This method enables the fast and reproducible conversion of a small amount of tissue or body fluid into a single, permanent digital file that represents the MS-measurable proteome of the sample [18]. The resulting proteome maps can then be analysed, re-analysed, compared and mined *in silico* to detect and quantify specific proteins across multiple samples. SWATH-MS technology is already being applied to clinical research on cancer, insulin resistance, cardiovascular disorders and Alzheimer's disease [19, 20].

The objective of the present study is to identify novel potential serum biomarkers of GH deficiency among prepubertal children using a combination of next-generation proteomics and machine-learning algorithms for feature selection.

2. Materials and methods

2.1. Patients and sample collection

The present study was approved by the research ethics committee of Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain; written informed consent was obtained from the parents and guardians of all patients and controls before their inclusion in the study.

Fifteen prepubertal patients (Tanner stage I) with GH deficit according to the Reina Sofia Hospital Paediatrics Service were enrolled in the study between 2013 and 2015. All patients were free of any other pathology and were naïve for any treatment 12 months before the start of the enrolment period. Fifteen healthy controls, also in Tanner development stage I, were selected after assessing that they were free of any pathology. The patients' average age was 9.86 ± 1.15 (age range 7.08–11.75), with a male:female ratio of 8:7. Serum levels of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides were measured in all the individuals included in the study. Blood from all individuals was collected into 8 mL Vacuette Z Serum Sep Clot Activator tubes (Greiner Bio-One, GmbH, Frickenhausen, Germany) and left to clot at room temperature for 2 h. Serum was then collected by centrifugation for 10 min at 3000g at 4 °C, and was aliquoted and stored at –80 °C. The analysed samples and groups are shown in Supplementary Table S1.

2.2. Sample preparation for LC-MS analysis

The seven most abundant proteins in the blood were depleted using the Hu-7 Multiple Affinity Removal System kit (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) following the manufacturer's instructions. Non-

depleted proteins were concentrated using 5000 molecular weight cut-off (MWCO) spin concentrators (Agilent Technologies); samples were then cleaned to remove any contaminants by protein precipitation with TCA/acetone and solubilised in 50 μ L of 0.2% RapiGest SF (Waters, Milford, MA, USA) in 50 mM ammonium bicarbonate. The total protein content was measured using the Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); 50 μ g of protein was subjected to trypsin digestion following a protocol adapted from Vowinckel et al. [21].

Briefly, protein samples were incubated with 5 mM DTT at 60 °C for 30 min and then with 10 mM iodoacetamide at room temperature and in darkness for 30 min. Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega, Madison, WI, USA) was added at a 1:40 trypsin:protein ratio and incubated at 37 °C for 2 h; the same amount of trypsin was again added and incubated at 37 °C for another 15 h. RapiGest was then precipitated by centrifugation after incubating with 0.5% TFA at 37 °C for 1 h. The final volume was adjusted with milliQ water and ACN to a final concentration of 0.5 μ g peptide/ μ L, 2.25% ACN, and 0.2% TFA; 1 \times of the iRT peptides (Biognosys AG, Schlieren/Zürich, Switzerland) were spiked in each sample.

2.3. Creation of the spectral library

In order to build the MS/MS spectral libraries, the peptide solutions were analysed by a shotgun data-dependent acquisition (DDA) approach using nano-LC-MS/MS. To obtain a good representation of the peptides and proteins present in all 30 samples, six pooled vials of five samples each were prepared that consisted of equal mixtures of the original samples, as shown in Supplementary Table S1. One μ g of each pooled sample (2 μ L) was separated into a nano-LC system Eksperit nLC415 (Eksigent, Dublin, CA, USA) using an Acclaim PepMap C18 column (75 μ m \times 25 cm, 3 μ m, 100 Å) (Thermo Fisher Scientific) at a flow rate of 300 nL/min. Water and ACN, both containing 0.1% formic acid, were used as solvents A and B, respectively. The gradient run consisted of 5% to 30% B for 120 min, 10 min at 90% B and finally 20 min at 5% B for column equilibration, for a total run time of 150 min.

As the peptides eluted, they were directly injected into a hybrid quadrupole-TOF mass spectrometer Triple TOF 5600+ (Sciex, Redwood City, CA, USA) operated with a 'top 65' data-dependent acquisition system in positive ion mode. A NanoSpray III ESI source (Sciex) was used for the interface between nLC and MS, with an application of 2600 V voltage. The acquisition mode consisted of a 250 ms survey MS scan from 350 to 1250 m/z followed by an MS/MS scan from 230 to 1700 m/z (60 ms acquisition time, rolling collision energy) of the top 65 precursor ions from the survey scan, for a total cycle time of 4.2 s. The fragmented precursors were then added to a dynamic exclusion list for 15 s; any singly charged ions were excluded from the MS/MS analysis.

The peptide and protein identifications were performed using Protein Pilot software (version 5.0.1, Sciex) with a human Swiss-Prot concatenated target-reverse decoy database (downloaded in March 2016) containing 20,200 target protein sequences, specifying iodoacetamide as Cys alkylation. The false discovery rate (FDR) was set to 0.01 for both peptides and proteins. The MS/MS spectra of the identified peptides were then used to generate the spectral library for SWATH peak extraction using the add-in for PeakView Software (version 2.1, Sciex) MS/MS^{ALL} with SWATH Acquisition MicroApp (version 2.0, Sciex). Peptides with a confidence score above 99% (as obtained from Protein Pilot database search) were included in the spectral library.

2.4. Relative quantification by SWATH acquisition

Thirty samples were analysed using a data-independent acquisition (DIA) method. Each sample (2 μ L) was analysed using the LC-MS equipment and LC gradient described above for building the spectral

library but instead using the SWATH-MS acquisition method. The method consisted of repeating a cycle that consisted of the acquisition of 50 TOF MS/MS scans (230 to 1500 m/z , high sensitivity mode, 96 ms acquisition time) of overlapping sequential precursor isolation windows of variable width (1 m/z overlap) covering the 400 to 1250 m/z mass range with a previous TOF MS scan (400 to 1250 m/z , 50 ms acquisition time) for each cycle. Total cycle time was 4.9 s. For each sample set, the width of the 50 variable windows was optimised according to the ion density found in the DDA runs using a SWATH variable window calculator worksheet from Sciex.

2.5. Data analysis

The targeted data extraction of the fragment ion chromatogram traces from the SWATH runs was performed by PeakView (version 2.1) using the MS/MS^{ALL} with SWATH Acquisition MicroApp (version 2.0). This application processed the data using the spectral library created from the shotgun data. Up to ten peptides per protein and seven fragments per peptide were selected, based on signal intensity; any shared and modified peptides were excluded from the processing. Twenty-minute windows and 20 ppm widths were used to extract the ion chromatograms; SWATH quantitation was attempted for all proteins in the ion library that were identified by ProteinPilot with an FDR below 1%. The retention times from the peptides that were selected for each protein were realigned in each run according to the iRT peptides spiked in each sample and eluted along the whole time axis. The extracted ion chromatograms were then generated for each selected fragment ion; the peak areas for the peptides were obtained by summing the peak areas from the corresponding fragment ions. PeakView computed an FDR and a score for each assigned peptide according to the chromatographic and spectra components; only peptides with an FDR below 5% were used for protein quantitation. Protein quantitation was calculated by adding the peak areas of the corresponding peptides. To test for differential protein abundance between the two groups, MarkerView (version 1.2.1, Sciex) was used for signal normalisation; differential abundance was tested by applying the Mann-Whitney test at the protein level, and q-value estimation for FDR control was applied using the qvalue R package [22].

To select those proteins that better discriminate between individuals with GH deficiency and controls, a feature-selection workflow that included three different algorithms for classification was applied using the bootfs R package [23]. The abundance levels of all the quantified proteins were analysed with a combination of three algorithms: random forest-Boruta (RF-Boruta), smoothly clipped absolute deviation-support vector machines (SCAD-SVM), and prediction analysis for microarrays (PAM); this combination produced a ranking of the proteins according to how well each classified a sample in the correct group. The feature-selection process was implemented as a bootstrapping procedure with 100 iterations to derive a final feature set, and the process was repeated 20 times. In order to assess the predictive accuracy of the top-ranked proteins (i.e. the ability to differentiate among both groups) and their combinations, a receiver operation characteristic curve (ROC) analysis was performed on these proteins and their combinations (by addition of the values at the protein level), which yielded the area under the curve (AUC) using the R package pROC [24]. A final biomarker set with the minimum number of features able to obtain the best classifying performance was then derived.

The significantly affected pathways and gene ontology (GO) over-represented components were analysed using Advaita Bio's iPathwayGuide (<http://www.advaitabio.com/ipathwayguide>). This analysis tool implements an impact-analysis approach, which takes into consideration not only the over-representation of differentially expressed genes in a given pathway (i.e. enrichment analysis) but also topological information such as the direction and type of all signals in a pathway and the position, role and type of each protein [25]. The data were analysed in the context of pathways obtained from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (release 78.0 + ,

2 June 2016) [26] and GOs from the Gene Ontology Consortium database (14 March 2016) [27]. For each GO term, the number of differentially expressed genes annotated to the term was compared to the number of genes expected by chance; iPathwayGuide was used to compute the statistical significance of observing more than the given number of differentially expressed genes and to calculate a p-value using a hypergeometric distribution.

3. Results and discussion

3.1. Shotgun analysis and spectral library

For each sample set, the 30 peptide mixtures were pooled in six samples and subjected to shotgun analysis to build the spectral library. As a result, after integrating all six data sets, 297 proteins and 9214 peptides were identified (FDR < 1% at both the protein and peptide levels); the list of identified proteins is shown in Supplementary Table S2. The identified MS/MS spectra were compiled into a spectral library containing 286 proteins (see Supplementary Table S3).

3.2. Variable Q1 isolation windows for SWATH acquisition methods

While the SWATH method generally uses a fixed 25 *m/z* window width for isolating ions at the Q1, the benefits of using variable Q1 windows for improving peptide identification and quantification have been demonstrated in a previous study [28]. We used the ion density found in the DDA runs to optimise the width of the Q1 isolation windows for the SWATH methods, which led to 50 variable windows (see Supplementary Fig. S1 and Supplementary Table S4). Smaller Q1 windows were used in the *m/z*-dense regions, which have many peptide precursors; wider windows were used in the *m/z* regions with fewer precursors, thus increasing specificity while still maintaining full mass range coverage.

3.3. Protein abundance changes

The fragment ion traces from the SWATH runs were extracted for the 30 samples using the procedure described above (up to ten peptides per protein and seven fragments per peptide, excluding modified peptides). A total of 11,125 fragment ions and 1590 peptides, corresponding to 263 proteins (see Supplementary Tables S5, S6 and S7, respectively).

It has been reported that SWATH allows for routine, reproducibly and high-throughput quantification of up to thousands of proteins per sample. Actually, the sensitivity of SWATH-MS quantification coupled to targeted data extraction has been determined to be slightly lower than in the gold standard targeting method SRM but higher than in a MS1/label-free quantification workflow, combining the strength of shotgun proteomics to detect a high number of analytes with the high accuracy, dynamic range, and reproducibility of SRM [17, 29]. However, the number of proteins quantified still depends on sample matrix, and serum and plasma, although easily accessible, are extremely challenging matrices in terms of identifying and quantifying proteins due to the huge complexity and dynamic range of protein abundances (12 orders of magnitude) [30]. In SWATH, then number of quantified proteins relies on the number of proteins in the spectral library. We have built an ad-hoc spectral library from pools of our experimental samples, which were analyzed on DDA runs, and therefore, the number of quantified proteins is related to the number of proteins that can be identified in these DDA runs. The use of an external (pre-constructed, not built from the studied samples) and more complete spectral library [31] may bring more protein identifications. Liu et al. [31], building the library from DDA runs of depleted and SAX-fractionated plasma samples combined with additional MS assays for plasma proteins from an in-house SWATH assay compendium, quantified 342 proteins in plasma samples. However, the use of external libraries has also some

disadvantages, such as the need for much more computational power in order to extract the correct ion chromatograms from the SWATH runs, and issues of alignment of elution times [32] which may increase the risk of inappropriate spectral assignment during targeted data extraction of SWATH files.

In addition, it has to be noted that we haven't adopted a peptide fractionation approach, which may bring more protein identifications and therefore more proteins in the spectral library. Using our sample preparation workflow (including a 120 min-gradient, with no pre-fractionation of the samples, although doing depletion of the seven highest abundance proteins), we have identified 297 serum proteins, finding a compromise between throughput, cost, and proteome depth but still maintaining the accuracy and reproducibility achieved by SWATH-MS. However, our figures compare favorably with similar studies: in a comparison of not-fractionated (but depleted) plasma, peptide SCX fractionation (6 fractions) and GeLC fractionation (6 fractions), Gautam et al. [33] identified 194, 251 and 342 plasma proteins, respectively. Our figures in terms of identified and quantified proteins are then comparable to those obtained with simple fractionation approaches, and better than those obtained with no-fractionation (see Table 1 at [34] for more examples). When not performing fractionation, our figures compare favorably to other LC-MS based methods: Geyer et al. [35], using a label-free approach, quantified 241 proteins in 15 technical replicate plasma samples (77% of 313 total identified proteins); Cominetti et al., [36] reported the consistently quantification of 114 proteins in all the samples from a large cohort using TMT isobaric labeling quantitation.

The fold changes observed for all the quantified proteins are shown in Supplementary Table S8, as are the Mann-Whitney p-values and FDR

Table 1
Proteins showing a significant difference in abundance and a twofold increase or decrease between the growth hormone deficiency (GHD) and control groups.

Protein accession	Protein	Fold-change GHD to control	Mann-Whitney p-value	q-value
Q92496	FHR4	5.99	2.80E-05	0.0004
P02042	HBD	5.93	6.71E-04	0.0021
P68871	HBB	5.43	2.82E-03	0.0067
P69905	HBA	4.61	3.23E-03	0.0073
P02751	FINC	3.75	4.81E-05	0.0004
P02452	CO1A1	3.75	4.02E-05	0.0004
P01880	IGHD	3.67	1.05E-03	0.0032
P02775	CXCL7	3.30	5.05E-06	0.0004
P00915	CAH1	3.14	1.87E-03	0.0049
P00918	CAH2	2.84	5.45E-03	0.0109
P11597	CETP	2.83	4.02E-05	0.0004
P07996	TSP1	2.75	2.80E-05	0.0004
P02776	PLF4	2.71	9.07E-06	0.0004
P09486	SPRC	2.58	1.10E-05	0.0004
P62987	RLA0	2.46	2.79E-02	0.0334
Q15063	POSTN	2.43	1.15E-04	0.0007
P06703	S10A6	2.27	1.14E-02	0.0177
P30043	BLVRB	2.26	6.19E-03	0.0117
Q15485	FCN2	2.23	2.23E-04	0.001
P22105	TENX	2.16	3.36E-05	0.0004
P32119	PRDX2	2.03	8.97E-03	0.0154
P02654	APOC1	0.42	2.02E-02	0.0263
P01861	IGHG4	0.34	3.81E-02	0.0431
P02655	APOC2	0.34	4.21E-02	0.0465
P05062	ALDOB	0.33	1.01E-02	0.0171
Q13790	APOF	0.32	2.80E-05	0.0004
P06727	APOA4	0.31	2.80E-05	0.0004
P02656	APOC3	0.27	6.19E-03	0.0117
P55056	APOC4	0.24	1.60E-04	0.0008
P02741	CRP	0.17	1.81E-02	0.0245
P02675	FIBB	0.07	1.62E-03	0.0044
P02679	FIBG	0.07	1.44E-02	0.0204
P02671	FIBA	0.05	1.94E-05	0.0004
P0DJ18	SAA1	0.03	5.76E-04	0.002
P0DJ19	SAA2	0.03	1.36E-04	0.0008

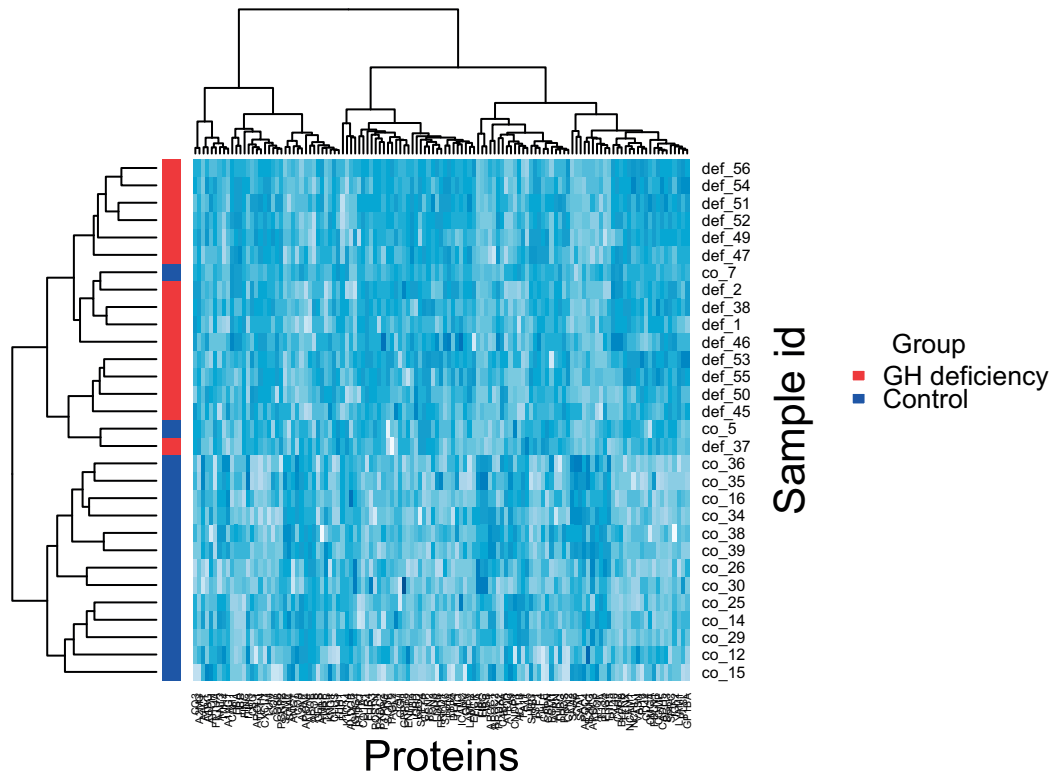


Fig. 1. The unsupervised clustering of the 30 analysed individuals using the 121 serum proteins changing in abundance according to the Mann-Whitney test, as measured by SWATH. Individuals from the GHD and control groups are shown in red and blue, respectively.

estimated q-values. The relationship between Mann-Whitney p-values and FDR q-values, and the number of expected false positives versus the number of significant tests, are shown in Supplementary Fig. S2. A total of 121 proteins resulted significantly different for a q-value cut-off of 0.05. Thirty-five of them were at least twofold increased (21 proteins) or decreased (14 proteins) in abundance compared with control (Table 1). The expression levels for the 121 significant proteins were visualised in a two-way hierarchical cluster analysis-based heatmap, which separated the analysed samples in the actual two groups (the GH deficiency and control groups) and found only two false positives (samples co_7 and co_5) (see Fig. 1).

3.4. Pathway and GO analysis

Pathway impact analysis was implemented on all 121 differentially abundant proteins using the software iPathwayGuide. A final p-value for each pathway was calculated using Fisher's method and then corrected for multiple comparisons using FDR correction. Using this approach, no pathway was found to be significantly affected by GHD when compared to healthy controls (Supplementary Fig. S2). The extracellular matrix (ECM) receptor interaction (KEGG: 04512), platelet activation (KEGG: 04611) and focal adhesion (KEGG: 04510) pathways showed FDR-corrected p-values of 0.085, with 8, 7 and 6 proteins differentially expressed, respectively (Supplementary Fig. S2). At the cell-extracellular matrix contact points, specialised structures (focal adhesions) participate in the structural link between membrane receptors and the actin cytoskeleton, while some of these structures' components are signalling molecules. The signalling events that these focal adhesions initiate culminate in reorganisation of the actin cytoskeleton (a prerequisite for changes in cell shape and motility) and gene expression (Supplementary Fig. S2C). Similar morphological alterations and gene-expression modulations are initiated by the binding of growth factors to their respective receptors, which emphasises the considerable crosstalk between adhesion- and growth factor-mediated signalling.

iPathwayGuide was also used for GO analysis, using an over-representation approach to compute the statistical significance of observing more than the given number of differentially expressed genes and then correcting the p-values for multiple comparisons using the weight-pruning approach. Fig. 2 shows the results of the GO analysis. Proteins related to platelet activation, cell adhesion and lipoprotein groups, which were found to be strongly enriched, are shown. These pathways and protein groups are related to cell motility and proliferation, transport between cells, and tissue development, which together point to the link between GHD proteome changes and tissue/organ structure and morphogenesis. Lipoprotein metabolism was also found to be greatly affected by GHD, since several lipoproteins (ApoA4, ApoB, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoC4, ApoD, ApoE, ApoF, and Apo H) were found to be down-regulated in GHD, with fold changes (GHD to control) ranging from 0.24 to 0.88 (Tables 1 and Supplementary Table S8). A few other HDL particles (SAA1, SAA2, and SAA4 and serum amyloid A-1, A-2, and A4, respectively) were also down-regulated in GHD, with fold changes as low as 0.028 for SAA1 and SAA2 (i.e. 35 times less abundant in GHD than in the controls). These results are consistent with those of previous studies, which have described an increase of several apolipoproteins following GH replacement therapy [13–15]. Interestingly, no statistically significant differences were found in serum levels of total, HDL- and LDL-cholesterol when comparing GHD group to control group (Table 2, Supplementary Table S9).

Therefore, decrease of HDL observed by proteomics is not associated with a decrease in serum HDL-cholesterol (nor total cholesterol) levels. Although GHD in adult life is associated with higher total and LDL-cholesterol, lower HDL-cholesterol levels, and a variable prevalence of hypertriglyceridaemia [37–40], the situation in GHD children is not so evident, with some studies reporting no abnormalities in lipid profiles in untreated GHD children [37, 41–44], and some other studies showing higher total and LDL-cholesterol but similar HDL-cholesterol and triglycerides [37, 45–49] in untreated GHD children than in controls. Therefore, our data showing no changes in HDL-cholesterol is

A

Name	# genes (DE/all)	Adjusted p-value
GO Cellular Components		
High-density lipoprotein particle	10/19	0.017
GO Molecular Functions		
Cell adhesion molecule binding	10/17	0.009
Substrate-specific transporter activity	12/21	0.018
Heparin binding	12/24	0.019
GO Biological Processes		
Platelet activation	11/15	2.400e-4
Positive regulation of gene expression	11/20	0.003
Cellular response to cytokine stimulus	12/19	0.004
Cell adhesion	25/53	0.033
Extracellular matrix organization	16/31	0.039

Table 2

Measured serum levels of total, HDL-, and LDL-cholesterol, and triglycerides for both groups (GHD and control), and p-values from tests assessing for significant differences.*

Parameter	GHD group Average ± SD	Control group Average ± SD	Shapiro- Wilk test p- value	p-value*
Total cholesterol (mg/dL)	173.00 ± 26.12	167.80 ± 33.89	0.99	0.6417
HDL-cholesterol (mg/dL)	54.40 ± 11.76	53.13 ± 12.18	0.22	0.7741
LDL-cholesterol (mg/dL)	107.00 ± 20.50	102.47 ± 32.50	0.19	0.6519
Triglycerides (mg/dL)	56.40 ± 23.01	59.33 ± 26.82	0.02	0.7713

SD, standard deviation.

* p-values correspond to Student's *t*-test p-value for total, HDL-, and LDL-cholesterol, and to Mann-Whitney *U* test p-value for triglycerides, according to Shapiro-Wilk normality test.

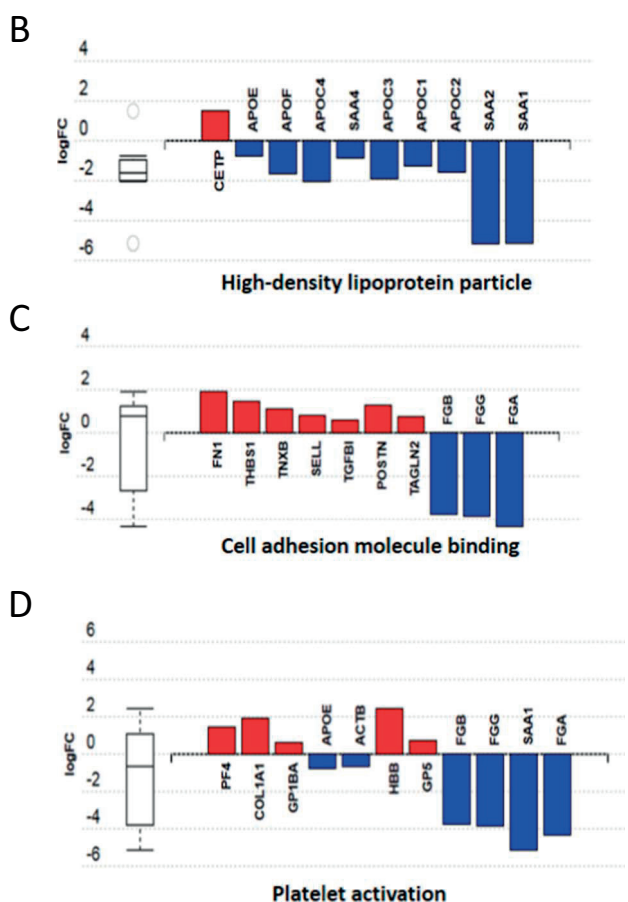


Fig. 2. (A) Over-represented cellular components, molecular functions and biological processes according to gene ontology (GO) analysis of the differentially expressed proteins between the GHD and control groups. DE = differentially expressed. Differentially expressed annotated genes for the top protein groups for (B) cellular components, (C) molecular functions and (D) biological processes are shown.

consistent with these previous studies. However, we found that HDL-related apolipoproteins, as measured by proteomics, decreased in abundance in untreated GHD children. HDL-cholesterol is carried within lipoprotein particles that are particularly heterogeneous in size, density, lipid and proteomic composition [50]. Actually, although chemically-measured HDL-cholesterol, which evaluates the cholesterol carried by HDL particles, is being used as a clinical marker of HDL-related cardioprotection, it has been hypothesized that alternative indices of HDL, such as number or size of HDL particles may be better

markers [50–52]. Specifically, available data reveal that the inverse relationship between the number of HDL particles and cardiovascular disease can be stronger than reduced HDL-cholesterol levels in order to predict cardiovascular risk [52]. Our findings could be therefore explained by a change in the number and size of the HDL-cholesterol particles: larger but fewer HDL-cholesterol particles would explain a lower abundance of HDL proteins in GHD children than in healthy controls while maintaining HDL-cholesterol levels, since HDL-proteins to HDL-cholesterol ratio (sphere surface area-to-mass ratio) decreases with HDL particle size. It's important to note that the GHD patients included in our study are all negative for the alteration of lipid metabolism, commonly observed in GHD adults, when it's assessed using the common analytical procedure in the clinic (chemically-measured cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides). The lower abundance of HDL-related apolipoproteins that we have found in GHD children could reveal the beginning of this alteration. Therefore, measurement of HDL-apolipoproteins in children could act not only as GHD biomarkers, but also for anticipating the decrease in HDL-cholesterol levels found in GHD adults that has been associated with higher cardiovascular risk. Our results thus suggest that (i) the decrease in serum apolipoproteins reflects the lipolysis standstill produced by GHD [2]; (ii) this decrease in serum apolipoproteins is reverted by GH treatment. Therefore, the apolipoprotein group could play an important role as a biomarker panel for the diagnosis of GHD as well as for treatment evaluation, although patients with altered lipid metabolism from non-GHD origin should be carefully studied as a potential source of false GHD positives.

3.5. Feature selection

To obtain a final biomarker set with the minimum number of features able to obtain the best classifying performance, the combination of three machine-learning algorithms was applied, using quantitative data from the 121 proteins with p-values < 0.05. This feature-selection analysis produced a ranking of the proteins according to how well each classified a sample in the correct group. The output of the biomarker-selection process was visualised as an importance graph (Fig. 3A), where the abundance and co-occurrence of selected features are visualised graphically as a network. In order to assess the robustness of the selection process, the analysis was repeated 20 times; candidate biomarker proteins were ranked according to their selection frequency (Fig. 3B and Supplementary Table S9). The top candidate was FIBA, which was selected in over 35% of the selection runs into a feature set. APOA4 and FHR4, identified as the second and third top proteins, respectively, were selected in over 32% of all selection runs. The next three top candidates were SAA2, FINC and CXCL7, which were observed in 27%, 23% and 20% of the selection runs, respectively. All

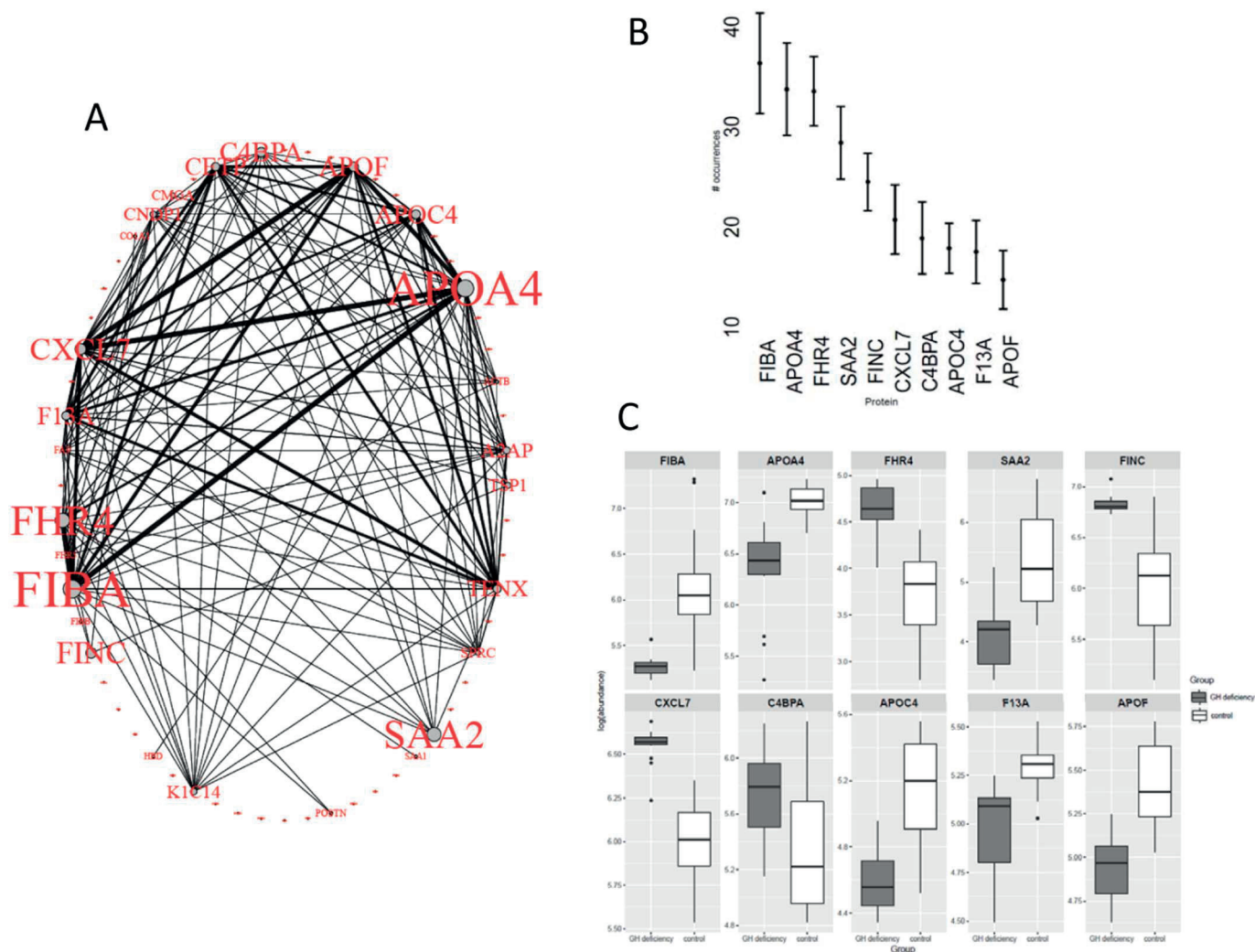


Fig. 3. Summary of biomarker selection results. (A) Importance graph; node ID size is proportional to the frequency of a particular protein in 100 bootstrapped feature sets. The edge width represents the co-occurrence of the nodes adjacent to the edge. (B) The feature-selection process was repeated 20 times; the ranks of each feature across these 20 repetitions are shown for the top 10 proteins, sorted in decreasing order. (C) Box-plots for the SWATH quantitative data for the top 10 proteins.

other candidate biomarkers showed a selection frequency below 20%. The SWATH measures for each of the top 10 proteins in the samples from both groups are shown in Fig. 3C.

In addition, the predictive accuracy (i.e. the ability to differentiate between both groups) of the top-ranked proteins and their combinations was assessed by ROC analysis. In Supplementary Table S10, the AUC values are shown for each of the top ten proteins as well as combinations of the two and three top six proteins, as derived from the feature-selection process. The best classification performance was obtained from the combination of ApoA4, FHR4 and CXCL7 (AUC of 1.0; 100% sensitivity and specificity).

4. Conclusion

To the best of our knowledge, this report is the first quantitative proteomics study for the discovery of non-invasive biomarkers of growth hormone deficiency in children. This paper has reported on a panel of non-invasive candidate protein biomarkers for GHD in children; 263 proteins could be confidently detected and quantified for each sample. Over-represented pathways and protein groups are related to cell motility and proliferation, transport between cells, and tissue development, all of which point to the link between proteome changes produced by GHD and tissue/organ structure and morphogenesis. The top ten serum protein biomarker candidates could be identified after

applying feature selection data analysis. The combination of three proteins – apolipoprotein A-IV, complement factor H-related protein 4 and platelet basic protein – showed the best classification performance among our data. In addition, the fact that the pathway and GO analysis we performed pointed to the apolipoproteins as over-represented highlights this protein group as an additional promising biomarker panel for the diagnosis of GHD and for treatment evaluation; these results are consistent with those of previous studies that have reported an increase of certain apolipoproteins following GH replacement therapy. Although the panel of potential biomarkers needs further validation, the ranking that the feature-selection process has provided could help to speed up the biomarker development process by prioritising the proteins to be targeted in a higher number of individuals. Therefore we suggest the top ranked proteins for further validation, including a larger number of samples and targeting a limited number of proteins.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [53] partner repository with the dataset identifier PXD007539. Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.003>.

Conflict of interest statement

All authors declare that they had no financial/commercial conflicts of interest in this study.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.003> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Investigator Initiated Research (IIR) Program from Pfizer (WI181900). Mass spectrometry analyses were performed at the IMIBIC Proteomics Unit, member of ProteoRed (Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos) and supported by grant PT13/0001, funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and FEDER.

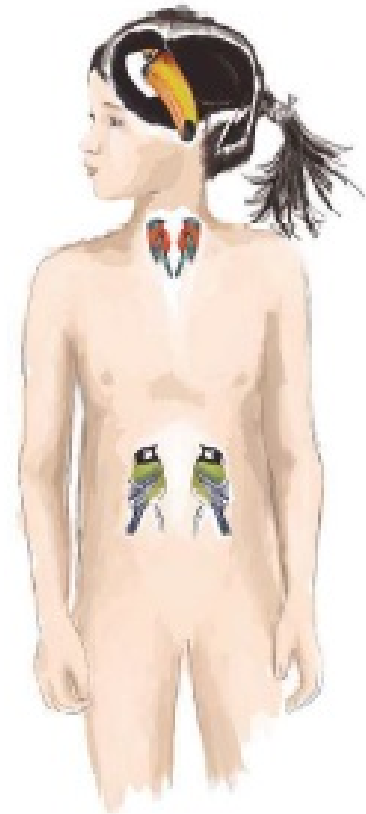
References

- W.C. David, A.D. Sara, R. Sally, Normal and aberrant growth, in: S. Melmed, K.S. Polonsky, P.R. Larsen, H.M. Kronenberg (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*, 13th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia (PA), 2016, pp. 964–1073.
- M. Ahmid, C.G. Perry, S.F. Ahmed, M.G. Shaikh, Growth hormone deficiency during young adulthood and the benefits of growth hormone replacement, *Endocr. Connect* 5 (2016) R1–R11.
- S.S. Lee, A.-L. Han, M.B. Ahn, S.H. Kim, K.S. Cho, S.H. Park, et al., Growth without growth hormone in combined pituitary hormone deficiency caused by pituitary stalk interruption syndrome, *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 22 (2017) 55–59.
- J. Argente, S.A. Abusewli, G. Bona, F. Chiarelli, C.J. Kelnar, N. Skordis, Isolated growth hormone deficiency in children and adolescents, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 14 (Suppl. 2) (2001) 1003–1008.
- G. Saggese, G.I. Baroncelli, S. Bertelloni, S. Barsanti, The effect of long-term growth hormone (GH) treatment on bone mineral density in children with GH deficiency. Role of GH in the attainment of peak bone mass, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (1996) 3077–3083.
- Growth Hormone Research Society, 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, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 3990–3993.
- S. Surinova, R. Schiess, R. Hüttenhain, F. Cerciello, B. Wollscheid, R. Aebersold, On the development of plasma protein biomarkers, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 5–16.
- P. Cifani, A. Kentsis, Towards comprehensive and quantitative proteomics for diagnosis and therapy of human disease, *Proteomics* 17 (2017) 1600079.
- J. Ding, S. Okada, J.O.L. Jorgensen, J.J. Kopchick, Novel serum protein biomarkers indicative of growth hormone doping in healthy human subjects, *Proteomics* 11 (2011) 3565–3571.
- R.G. Kay, C.S. Creaser, Application of mass spectrometry-based proteomics techniques for the detection of protein doping in sports, *Expert Rev. Proteomics* 7 (2010) 185–188.
- P. Ferro, R. Ventura, C. Pérez-Mañá, M. Farré, J. Segura, Genetic and protein biomarkers in blood for the improved detection of GH abuse, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128 (2016) 111–118.
- B. Andersson, R. Decker, A.F. Nierop, I. Bosaeus, K. Albertsson-Wikland, G. Hellgren, Protein profiling identified dissociations between growth hormone-mediated longitudinal growth and bone mineralization in short prepubertal children, *J. Proteomics* 74 (2011) 89–100.
- R. Decker, B. Andersson, A.F. Nierop, I. Bosaeus, J. Dahlgren, K. Albertsson-Wikland, G. Hellgren, Protein markers predict body composition during growth hormone treatment in short prepubertal children, *Clin. Endocrinol.* 79 (2013) 675–682.
- D. Cruz-Topete, J.O.L. Jorgensen, B. Chistensen, L. Sackman-Sala, T. Krusenstjerna-Hafstrom, A. Jara, et al., Identification of new biomarkers of low-dose GH replacement therapy in GH deficient patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) 2089–2097.
- S.H. Heo, J.-H. Choi, Y.-M. Kim, C.-W. Jung, J. Lee, H.Y. Jin, et al., Comparative proteomic analysis in children with idiopathic short stature (ISS) before and after short-term recombinant human growth hormone (rhGH) therapy, *Proteomics* 13 (2013) 1211–1219.
- A.F. Altelaar, J. Munoz, A.J. Heck, Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics, *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013) 35–48.
- L.C. Gillet, P. Navarro, S. Tate, H. Röst, N. Selevsek, L. Reiter, et al., Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) (O111.016717).
- T. Guo, P. Kouvonen, C.C. Koh, L.C. Gillet, W.E. Wolski, H.L. Röst, et al., Rapid mass spectrometric conversion of tissue biopsy samples into permanent quantitative digital proteome maps, *Nat. Med.* 21 (2015) 407–413.
- I. Ortea, A. Rodríguez-Ariza, E. Chicano-Gálvez, M.S. Arenas Vacas, B. Jurado Gámez, Discovery of potential protein biomarkers of lung adenocarcinoma in bronchoalveolar lavage fluid by SWATH MS data-independent acquisition and targeted data extraction, *J. Proteomics* 138 (2016) 106–114.
- S.I. Anjo, C. Santa, B. Manadas, SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: from basic research to clinical applications, *Proteomics* 17 (2017) 1600278.
- J. Vowinckel, F. Capuano, K. Campbell, M.J. Deery, K.S. Lilley, M. Ralsler, The beauty of being (label)-free: sample preparation methods for SWATH-MS and next-generation targeted proteomics, [v2; ref status: indexed, <http://f1000r.es/36i>], *F1000Research* 2 (2014) 272.
- J.D. Storey, A.J. Bass, A. Dabney, D. Robinson, qvalue: Q-value Estimation for False Discovery Rate Control. R Package Version 2.10.0, <http://github.com/jdstorey/qvalue>, (2015).
- J. Sonntag, C. Bender, Z. Soons, S. von der Heyde, R. König, S. Wiemann, et al., Reverse phase protein array based tumor profiling identifies a biomarker signature for risk classification of hormone receptor-positive breast cancer, *Transl. Proteomics* 2 (2014) 52–59.
- X. Robin, N. Turck, A. Hainard, N. Tiberti, F. Lisacek, J.C. Sanchez, M. Müller, pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves, *BMC Bioinf.* 12 (2011) 77.
- A.L. Tarca, S. Draghici, P. Khatri, S.S. Hassan, P. Mittal, J.S. Kim, et al., A novel signaling pathway impact analysis, *Bioinformatics* 25 (2009) 75–82.
- M. Kanehisa, S. Goto, KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 27–30.
- M. Ashburner, C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, et al., Gene ontology: tool for the unification of biology, *Nat. Genet.* 25 (2000) 25–29.
- Y. Zhang, A. Bilbao, T. Bruderer, J. Luban, C. Stranbio-De-Castilla, F. Lisacek, et al., The use of variable Q1 isolation windows improves selectivity in LC-SWATH-MS acquisition, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 4359–4371.
- Y. Liu, R. Hüttenhain, S. Surinova, L.C.J. Gillet, J. Mouritsen, R. Brunner, P. Navarro, R. Aebersold, Quantitative measurements of N-linked glycoproteins in human plasma by SWATH-MS, *Proteomics* 13 (2013) 1247–1256.
- R. Schiess, B. Wollscheid, R. Aebersold, Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery, *Mol. Oncol.* 3 (2009) 33–44.
- Y. Liu, A. Buil, B.C. Collins, L.C. Gillet, L.C. Blum, L.-Y. Cheng, O. Vitek, et al., Quantitative variability of 342 plasma proteins in a human twin population, *Mol. Syst. Biol.* 11 (2015) 786.
- N.A. Haverland, L.M. Villeneuve, P. Ciborowski, H.S. Fox, The proteomic characterization of plasma or serum from HIV-infected patients, *Methods Mol. Biol.* 1354 (2016) 293–310.
- P. Gautam, S.C. Nair, K. Ramamoorthy, C.V. Swamy, R. Nagaraj, Analysis of human blood plasma proteome from ten healthy volunteers from Indian population, *PLoS One* 8 (2013) e72584.
- M. Pernemalm, J. Lehtiö, Mass spectrometry-based plasma proteomics: state of the art and future outlook, *Expert Rev. Proteomics* 11 (2014) 431–448.
- P.E. Geyer, N.A. Kulak, G. Pichler, L.M. Holdt, D. Teupser, M. Mann, Plasma proteome profiling to assess human health and disease, *Cell Systems* 2 (2016) 185–195.
- O. Cominetti, A. Núñez Galindo, J. Corthésy, S. Oller Moreno, I. Irincheeva, A. Valsesia, A. Astrup, et al., Proteomic biomarker discovery in 1000 human plasma samples with mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 15 (2016) 389–399.
- J. Rothermel, T. Reinehr, Metabolic alterations in paediatric GH deficiency, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30 (2016) 757–770.
- J. Isgaard, M. Arcopinto, K. Karason, A. Cittadini, GH and the cardiovascular system: an update on a topic at heart, *Endocrine* 48 (2015) 25–35.
- C. Gazzaruso, M. Gola, I. Karamouzis, R. Giubbini, A. Giustina, Cardiovascular risk in adult patients with growth hormone (GH) deficiency and following substitution with GH-an update, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) 18–29.
- J.O. Johansson, K. Landin, L. Tengborn, T. Rosén, B.A. Bengtsson, High fibrinogen and plasminogen activator inhibitor activity in growth hormone-deficient adults, *Arterioscler. Thromb.* 14 (1994) 434–437.
- M. Salerno, V. Esposito, V. Farina, G. Radetti, A. Umbaldo, D. Capalbo, L. Spinelli, et al., Improvement of cardiac performance and cardiovascular risk factors in children with GH deficiency after two years of GH replacement therapy: an observational, open, prospective, case-control study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 1288–1295.
- V. Ramistella, M. Wasniewska, S. Arasi, M. Catena, M.R. Velletri, D. Corica, S. Santucci, F. De Luca, Cross-sectional and prospective study of the effects of GH therapy on metabolic panel in children with GH deficiency, *Pediatr. Med. Chir.* 36 (2014) 104.
- A.M. Boot, M.A. Engels, G.J. Boerma, E.P. Krenning, S.M. De Muinck Keizer-Schrama, Changes in bone mineral density, body composition, and lipid metabolism during growth hormone (GH) treatment in children with GH deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2423–2428.
- R. Lanes, M. Paoli, E. Carrillo, O. Villaroel, A. Palacios, Cardiovascular risk of young growth-hormone-deficient adolescents. Differences in growth-hormone-treated and untreated patients, *Horm. Res.* 60 (2003) 291–296.
- R. Lanes, P. Gunzler, E. Lopez, S. Esaa, O. Villaroel, R. Revel-Chion, Cardiac mass and function, carotid artery intima-media thickness, and lipoprotein levels in growth hormone-deficient adolescents, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 1061–1065.
- A. Ciresi, M.C. Amato, A. Criscimanna, A. Mattina, C. Vetro, A. Galluzzo, G. D'Acquisto, C. Giordano, Metabolic parameters and adipokine profile during GH replacement therapy in children with GH deficiency, *Eur. J. Endocrinol.* 156 (2007) 353–360.
- K.A. Metwalley, H.S. Farghaly, H.A. Abd El-Hafeez, Evaluation of left ventricular mass and function, lipid profile, and insulin resistance in Egyptian children with

- growth hormone deficiency: a single-center prospective case-control study, *Indian J. Endocrinol. Metab.* 17 (2013) 876–882.
- [48] D. Capalbo, R.G. Mattace, A. Esposito, R. Di Mase, F. Barbieri, R. Meli, D. Bruzzese, M. Salerno, Cluster of cardiometabolic risk factors in children with GH deficiency: a prospective, case-control study, *Clin. Endocrinol.* 80 (2014) 856–862.
- [49] R. Lanes, A. Soros, P. Gunczler, M. Paoli, E. Carrillo, O. Villaroel, A. Palacios, Growth hormone deficiency, low levels of adiponectin, and unfavorable plasma lipid and lipoproteins, *J. Pediatr.* 149 (2006) 324–329.
- [50] B.F. Asztalos, M. Tani, E.J. Schaefer, Metabolic and functional relevance of HDL subspecies, *Curr. Opin. Lipidol.* 22 (2011) 176–185.
- [51] S. Mora, R.J. Glynn, P.M. Ridker, High-density lipoprotein cholesterol, size, particle number, and residual vascular risk after potent statin therapy, *Circulation* 128 (2013) 1189–1197.
- [52] A. Kontush, HDL particle number and size as predictors of cardiovascular disease, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 218.
- [53] J.A. Vizcaíno, A. Csordas, N. Del-Toro, J.A. Dianes, J. Griss, I. Lavidas, et al., 2016 update of the PRIDE database and related tools, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D447–D456.

39

Congreso de la Sociedad Española de
**Endocrinología
Pediátrica**



Málaga, 10-12 de mayo de 2017

Proceedings of the Spanish Pediatric Endocrinology Congress 2017

Ponencias y Resúmenes de Comunicaciones

maduradores puberales fueron similares a población de referencia. La ganancia de talla se relacionó con la velocidad de crecimiento durante el primer año de tratamiento, pero no con la respuesta a los estímulos de GH. No se observaron alteraciones en el perfil metabólico.

O2/d2-014 Crecimiento

CONTRIBUCIÓN AL DIAGNÓSTICO DEL DÉFICIT DE HORMONA DE CRECIMIENTO (DGH). NUEVOS MARCADORES

R Cañete Estrada¹, I. Ruiz Sánchez², MD. Cañete Vázquez³, J. Caballero Villarraso⁴, E. Chicano Gálvez⁵, I. Ortea García⁵

(¹)Facultad de Medicina. IMIBIC. Universidad de Córdoba. (²)Facultad de Medicina. Córdoba. (³)IMIBIC. Córdoba. (⁴)Servicio de Análisis Clínicos. HURS. Córdoba. (⁵)Servicio de Proteómica. IMIBIC. Córdoba

Introducción:

El diagnóstico del DGH no se sustenta de acuerdo a los criterios actuales. Hay subjetividad en la valoración de la maduración ósea y las pruebas de secreción de GH no son unos marcadores válidos y criticados por todos.

Biomarcador	Ranking según algoritmos de clasificación	Fold change (DGH/control)	p-valor	AUC (análisis ROC)
PROTEINA.1	1	0.05	1.94·10 ⁻⁵	0.960
PROTEINA.2	2	5.99	2.80·10 ⁻⁵	0.951
PROTEINA.3	3	0.31	2.80·10 ⁻⁵	0.951
PROTEINA.4	4	3.75	4.81·10 ⁻⁵	0.938
PROTEINA.5	5	3.30	5.05·10 ⁻⁶	0.991
PROTEINA.6	6	0.51	1.15·10 ⁻⁴	0.916
PROTEINA.7	7	0.03	1.36·10 ⁻⁴	0.911
PROTEINA.8	8	0.24	1.60·10 ⁻⁴	0.907

Objetivo:

Separar, cuantificar, identificar y comparar las proteínas séricas en niños prepúberes con DGH vs niños sin patología e identificar biomarcadores potenciales asociados con el déficit de GH, gracias a la expresión diferencial del proteoma sérico en estos niños con técnicas proteómicas de 3ª generación de gran fiabilidad y reproducibilidad. (SWATH) (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra).

Pacientes, material y métodos.

Se estudiaron 30 pacientes entre los 7-11 años prepúberes, 15 con DGH y 15 sanos como grupo control. La edad media fue de 9.86±1.15 años (rango de 7.08 a 11 años) con un ratio entre varones y mujeres de

8:7. Sin diferencias significativas entre las edades. El diagnóstico de DGH se hizo según los criterios de Growth Hormone Research Society (JCEM 2000; 85: 3990-3) con picos de GH en pruebas de estímulo inferiores a 7.3 ng/mL.

Se inició separando las 7 proteínas mayoritarias en suero: albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobulina y fibrinógeno, las restantes fueron concentradas.

Tabla 1. Comparación evolución auxológica en una población nacida PEG en función del tratamiento: rhGH ó rhGH+aLHRH.

	Combinado rhGH+aGnRH			rhGH			p
	N	M	DT	N	M	DT	
Talla inicio rhGH SDS	36	-2.3	1.12	103	-2.72	0.69	*
Peso inicio rhGH SDS	36	-1.24	0.9	103	-1.75	0.85	**
Pronóstico crecimiento inicio rhGH SDS	20	-2.6	0.75	32	-2.16	0.65	*
Velocidad de crecimiento pretratamiento SDS	36	-0.47	2.36	103	-0.82	1.49	n.s
Velocidad crecimiento 1año SDS	36	0.99	1.96	103	2.42	1.77	***
Velocidad crecimiento 2año SDS	33	1.04	1.71	95	1.77	1.58	*
Talla inicio pubertad SDS	32	-1.82	0.84	88	-1.96	0.78	n.s
Pronóstico crecimiento inicio pubertad SDS	28	-2.82	0.59	69	-1.63	0.93	***
Ganancia de talla adulta SDS	35	0.44	0.98	80	0.96	0.7	**
Talla adulta SDS	35	-1.85	0.89	80	-1.63	0.65	n.s
IMC adulto SDS	35	-0.15	1.13	79	-0.33	0.9	n.s

* p<0.05 ** p<0.01 ***p<0.001 n.s. no significativo

Resultados:

Los espectros MS/MS identificaron 263 proteínas de las cuales 109 son diferenciales (p-valor<0.05). Después se aplicó una combinación de tres algoritmos de clasificación de biomarcadores (RF-Boruta, SCAD-SVM, y PAM) utilizando el paquete bootfs en el software estadístico "R", con los cuales se escogieron las 8 proteínas más significativas y con la prueba de Mann-Whitney para cada biomarcador se obtuvo un p.valor que osciló 1.94x10⁻⁵ y 5.05x10⁻⁶, el fold-change y el análisis ROC están en la tabla.

Al combinar dos, tres, cuatro proteínas hay entre 93.3% y 100% de sensibilidad y especificidad entre 80.9% y 100%.

Con cinco proteínas hay una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100%.

Conclusiones:

Hay 109 proteínas diferenciales en niños con DGH para su diagnóstico.

Con solo 5 proteínas hay diferencias entre niños con déficit de GH y niños sanos. (S100%; E100%).

O2/d2-015 Crecimiento

DESARROLLO PUBERAL Y TRATAMIENTO COMBINADO CON HORMONA DE CRECIMIENTO Y ANÁLOGOS DE LHRH EN NIÑOS NACIDOS PEQUEÑOS PARA LA EDAD GESTACIONAL (PEG) SEGUIDOS HASTA EDAD ADULTA

A De Arriba Muñoz¹, A. Beisti Ortego², MJ. Sánchez Malo³, M. Ferrer Lozano³, JI. Labarta Aizpún³

(¹)Hospital Universitario Miguel Servet/Endocrinología Pediátrica. (²)Fundación Hospital Calahorra. Calahorra. (³)Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza

La Unidad de Innovación del Instituto Maimónides de Investigaciones Biomédicas (IMIBIC) informa que:

En los V Premios IMIBIC-Roche de Innovación Biomédica celebrados el 11 de junio de 2018 se ha premiado el trabajo que lleva por título 'Método rápido de detección por proteómica de biomarcadores séricos para el diagnóstico del déficit de hormona de crecimiento en el niño' presentado por los Doctores: Ignacio Ortea García, Isabel Ruíz Sánchez, Ramón Cañete Estrada y María Dolores Vázquez Cañete dentro de la categoría de categoría 'Proyectos de innovación basados en nuevas ideas o resultados derivados de la investigación biomédica'.

Firmado:



Begoña Roibás da Torre

Secretaria de la Comisión de Evaluación de los V Premios IMIBC-Roche

