ARIANE KASAI

**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR
NO EPITÉLIO GÁSTRICO E SOBRE A EXPRESSÃO E OS NÍVEIS DE GHRELINA
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2009

ARIANE KASAI

**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR
NO EPITÉLIO GÁSTRICO E SOBRE A EXPRESSÃO E OS NÍVEIS DE GHRELINA
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Eliana P. Alvares

São Paulo
2009

RESUMO

Kasai A. Efeito da desnutrição protéica sobre a proliferação celular no epitélio gástrico e sobre a expressão e os níveis de ghrelina durante o desenvolvimento pós-natal em ratos [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O epitélio gástrico de ratos sofre importantes modificações morfofisiológicas importantes durante o primeiro mês de vida pós-natal e a dieta é um dos principais fatores que influenciam esse desenvolvimento. No presente trabalho, avaliamos os efeitos da restrição protéica sobre o epitélio gástrico de ratos com 14, 30 e 50 dias de vida pós-natal. Ratos Wistar foram submetidos à dieta com 20% de proteína (C) ou de restrição protéica a 8% (RP) durante todo o período pré e pós-natal. A proliferação celular foi analisada pelo Índice Metafásico (IM) e Índice de Síntese de DNA (IS). Além disso, observamos a massa corpórea, massa do estômago e comprimento do intestino desses animais. Paralelamente, avaliamos a presença de ghrelina no epitélio gástrico por imunohistoquímica e sua concentração plasmática por ensaio imunoenzimático (EIA). Animais do grupo RP apresentaram massa corpórea, massa do estômago e do comprimento do intestino reduzidos em relação aos animais do grupo C ($p < 0,05$). A proliferação celular no epitélio gástrico em todas as idades estudadas do grupo RP também se apresentou reduzida ($p < 0,05$). Observamos um maior número de células imunomarcadas para ghrelina em animais com 30 e 50 dias do grupo RP em comparação aos animais de mesma idade do grupo C ($p < 0,05$). Não houve diferença no número de células imunomarcadas para ghrelina entre os animais de 14 dias. Os níveis plasmáticos de ghrelina apresentaram a mesma tendência observada na imunomarcção. A partir dos resultados obtidos, enfatizamos a importância do consumo de quantidade adequada de proteína durante o desenvolvimento gástrico de ratos e observamos que a ghrelina apresenta resposta hormonal diferente de acordo com a idade do animal.

Palavras-chave: Estômago. Restrição protéica. Ghrelina.

ABSTRACT

Kasai A. Effect of protein restriction on cell proliferation of the gastric epithelium and on ghrelin levels and expression throughout the postnatal development of rats [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The gastric epithelium of rats undergoes morphophysiological changes throughout the first month of life and diet is one of the main factors influencing the development. This study aimed to evaluate the effect of protein restriction on stomach development of rats at 14, 30 and 50 days. Wistar rats were fed a 20% protein diet (NP) or 8% protein diet (RP) throughout the pre- and post-natal life. We analyzed the cell proliferation by calculating the Metaphasic (MI) and DNA synthesis (SI) indexes. We also observed the body and stomach weight and small intestine length. Additionally, we evaluated ghrelin in gastric epithelium by immunohistochemistry and its plasma levels by immunoenzymatic assay (EIA). Body weight, stomach weight and small intestine length were reduced in RP animals when compared to C animals ($p < 0.05$). Cell proliferation in the gastric epithelium also decreased in the RP group at all ages ($p < 0.05$). We observed an increase in the number of labeled cells for ghrelin in 30- and 50-d-old RP rats when compared to the C group at the same ages ($p < 0.05$) and no difference was found in 14-d-old animals. Plasma ghrelin levels showed the same results observed in immunohistochemical reactions. Therefore, we can conclude that protein restriction can affect the cell proliferation in all studied ages. These results emphasize the importance of diet protein on the development of gastric mucosa and protein restriction seems to differently modulate ghrelin response at different ages.

Key words: Stomach. Protein restriction. Ghrelin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estômago

O estômago é um órgão do trato gastrointestinal que, em ratos e camundongos, pode ser dividido em três regiões histologicamente distintas, denominadas: córnea, corpo e antro (Lee et al., 1982). A região da córnea apresenta-se como uma porção dilatada e em forma de saco, contínua ao esôfago, revestida por um epitélio não-glandular, estratificado pavimentoso queratinizado (Lee et al., 1982). O corpo e o antro são formados por um epitélio prismático simples que sofre invaginação formando numerosas fossetas onde se abrem de 2 a 4 glândulas tubulares (Lee et al., 1982).

A superfície luminal e as fossetas são revestidas por células secretoras de muco denominadas células mucosas superficiais. A glândula gástrica de um rato adulto pode ser subdividida em três segmentos: istmo, colo e base (Helander, 1981) (Figura 1). Os diversos tipos celulares que compõem a glândula são: células parietais (oxínticas), células zimogênicas (principais), células mucosas do colo, células endócrinas e células indiferenciadas (Helander, 1981; Kataoka et al., 1984) (Figura 1).

Figura 1. À esquerda: Fotomicrografia de epitélio gástrico de ratos (Aumento original: X20; coloração: Hematoxilina e Eosina). À direita: Esquema simplificado de glândula gástrica de rato adulto. (Esquema adaptado de Modlin et al., 2003).

As células parietais podem ser encontradas em toda a extensão glandular, porém são mais abundantes na região do istmo e colo da glândula. São células

grandes quando comparadas às outras que constituem a glândula gástrica, apresentam uma rede de canalículos e são caracterizadas pelo alto número de mitocôndrias (Helander, 1981). Produzem íons H^+ e Cl^- que na luz gástrica formam o ácido clorídrico (Helander, 1981), que tem ação bacteriostática e é responsável pela ativação da pepsina (Johnson, 1985). As células zimogênicas são secretoras de pepsinogênio que, em presença de pH ácido, é convertido em pepsina, a enzima responsável pela digestão de proteínas (clivagem de ligações peptídicas) (Johnson, 1985). Localizam-se na base da glândula gástrica e apresentam coloração basofílica devido à grande concentração de RNA na região basal de seu citoplasma, enquanto os grânulos contendo pepsinogênio encontram-se no ápice da célula (Helander, 1981).

As células mucosas do colo são pequenas e piramidais, e localizam-se entre as células parietais na região do colo da glândula (Helander, 1981). São produtoras de muco (Helander, 1981), importante para a lubrificação da parede do estômago e proteção contra danos físicos e químicos causados pela ingesta (Johnson, 1985; Laine et al., 2008).

As células endócrinas são encontradas dispersas por toda a glândula gástrica, porém em maior quantidade na região basal. Existe uma ampla diversidade de tipos celulares endócrinos, tais como células “enterochromaffin-like” (ECL), G, D, “X/A-like”, dentre outras. As células ECL localizam-se principalmente no corpo gástrico e são repletas de grânulos contendo histamina (Helander, 1981). A célula D produz somatostatina que age sobre as células parietais, inibindo a ação da gastrina (Helander, 1981). Células X/A-like são produtoras de ghrelina, hormônio que estimula a liberação do hormônio de crescimento (GH) e também o apetite (Kojima et al., 1999; Date et al., 2000). No antro, a célula G é responsável pela secreção de gastrina que, entre outras funções, estimula a produção de ácido gástrico (Helander, 1981).

As células epiteliais gástricas originam-se a partir de células-tronco localizadas na região do istmo e colo da glândula (Simões, 1992; Karam e Leblond, 1999). Todas as células que revestem a unidade fosseta-glândula da mucosa do corpo do estômago têm origem a partir dessas células-tronco que migram bi-direcionalmente para originar as diferentes linhagens celulares que constituem a glândula gástrica (Karam e Leblond, 1999). Estudos morfológicos e funcionais sugerem que a partir dessas células-tronco surgem células pré-mucosas que migram

em direção à fosseta e se diferenciam em células mucosas superficiais; células pré-parietais que têm migração bi-direcional e originam células parietais; células pré-mucosas do colo migram em direção à região do colo, onde se diferenciam em células mucosas do colo, que continuam migrando em direção à base da glândula para originar células pré-zimogênicas e zimogênicas; e células pré-enteroendócrinas que podem dar origem aos diferentes tipos celulares endócrinos (Karam e Leblond, 1999).

O corpo do estômago, principal região secretora do órgão, apresenta mucosa espessa devido à grande quantidade de glândulas que a preenchem (Helander, 1981). No animal adulto, essa região é constituída por fossetas curtas e glândulas tubulares alongadas formadas pelos diferentes tipos celulares mencionados, enquanto a região do antro possui fossetas profundas e glândulas relativamente curtas, compostas por células mucosas e endócrinas (Lee et al., 1982).

O estômago possui três funções básicas: a) atividade secretora: secreção de ácido clorídrico, pepsinogênio, fator intrínseco, muco, água, e alguns eletrólitos; b) ação endócrina: síntese de hormônios como a gastrina, somatostatina, ghrelina, entre outros e c) mistura e trituração do alimento ao fluido estomacal (Johnson, 1985).

A mucosa gástrica desenvolve-se tardiamente na vida fetal do rato e continua a sofrer modificações morfológicas e fisiológicas importantes durante o primeiro mês de vida pós-natal (Simões, 1992). No início do desenvolvimento do animal, as glândulas gástricas não apresentam regiões distintas e são pouco profundas. Nessa fase é possível identificar apenas células parietais e células em diferenciação (Kataoka et al., 1984; Simões, 1992).

Por volta da terceira semana de vida pós-natal, o amadurecimento estrutural e funcional das células do epitélio gástrico ocorre concomitantemente com a transição alimentar do animal. Até os 14 dias de vida, o filhote alimenta-se exclusivamente de leite e, após esse período, começa a se alimentar com ração mantendo uma alimentação mista até a fase do desmame, que ocorre por volta dos 21 dias de vida (Henning, 1981). Enquanto o filhote passa por esse período de transição entre a amamentação e a ingestão de ração (Henning, 1981), ocorrem os últimos estágios de diferenciação das células gástricas. A célula zimogênica finaliza sua maturação, com a mudança no tipo de pepsinogênio produzido (Kageyama, 2002). As células mucosas do colo são morfológicamente evidentes somente a partir da 3ª semana de

vida pós-natal (Kataoka et al., 1984), período em que também ocorre o desenvolvimento dos receptores para gastrina (Takeuchi et al., 1981). Por volta do 22º dia de vida, as regiões do istmo, colo e base começam a ser reconhecidas (Simões, 1992).

Esta transição de dieta, passando de um alimento rico em gorduras e lactose e pobre em carboidratos para um alimento sólido, rico em carboidratos e sacarose e pobre em gorduras (Henning, 1981), é paralela a alterações importantes como a acidificação gradual do conteúdo gástrico (Johnson, 1985). Durante as duas primeiras semanas após o nascimento o pH é aproximadamente 4 e diminui para 2,5 logo após o desmame (Johnson, 1985), quando o órgão deverá estar apto a digerir ração sólida.

Do ponto de vista de cinética celular, o epitélio gástrico dos ratos jovens apresenta diferenças em relação aos animais adultos. De modo geral, pode-se dizer que os índices proliferativos são mais baixos nos animais jovens devido ao comprometimento desses epitélios com o crescimento e não ainda com reposição de células. Por outro lado, o compartimento proliferativo é mais amplo, abrangendo toda a glândula gástrica (Alvares, 1992). A cinética celular deste epitélio continua a sofrer alterações até a maturação completa, que ocorre após 30 dias de idade (Simões, 1992).

No rato adulto, o compartimento proliferativo é restrito às regiões do istmo e colo da glândula (Alvares, 1992; Simões, 1992). A partir desse compartimento, as células migram principalmente em direção à superfície para reposição celular (Karam e Leblond, 1993a).

Todo o processo de renovação celular, que inclui proliferação, migração, diferenciação, morte e exfoliação, é controlado por um conjunto de agentes. Os mecanismos que coordenam o crescimento e a maturação do trato gastrointestinal envolvem diferentes fatores como as mudanças na dieta do animal, programa genético, presença de hormônios e fatores de crescimento (Lee e Lebenthal, 1983; De Andrade Sá et al., 2008).

Diversos estudos demonstraram que alterações na dieta como o jejum alimentar influenciam positivamente a proliferação celular no epitélio gástrico de animais lactentes (Alvares, 1992; Alvares e Gama, 1993). Essa resposta é inversa à observada em animais com 30 dias de vida pós-natal, que apresentam um quadro inibitório (Alvares e Gama, 1993) semelhante ao animal adulto (Alvares, 1987).

Quando o rato sofre desmame precoce aos 15 dias de idade, passando para alimentação exclusivamente semi-sólida (ração) e é submetido ao jejum aos 18 dias de idade, a proliferação celular é inibida (Gama e Alvares, 2000). Assim, a mucosa gástrica desses filhotes passa a responder ao jejum como o epitélio gástrico de um rato adulto, evidenciando a dependência da maturação da proliferação celular desse epitélio em função da alimentação.

O leite e os hormônios presentes no leite (Koldovský, 1980) e o próprio desmame, do ponto de vista fisiológico, têm profunda influência sobre o desenvolvimento normal da mucosa gástrica e também sobre a proliferação celular. A somatostatina e o hormônio de liberação do hormônio luteinizante (LHRH) são hormônios encontrados no leite e inibem a proliferação do epitélio gástrico tanto *in vivo* (Gama e Alvares, 1996) como *in vitro* (Goldfeder e Alvares, 2001). Corticosteróides, também presentes no leite, atuam sobre o epitélio gastrointestinal de animais em desenvolvimento, promovendo a maturação e a diferenciação celular (Henning, 1981). A administração de glicocorticóides em ratos lactentes estimula o desenvolvimento precoce dos receptores para gastrina (Peitsch et al., 1981), a atividade precoce de pepsinogênio (Furihata et al., 1972; Ikesaki e Johnson, 1983) e inibe a proliferação celular no epitélio gástrico (Gama e Alvares, 1998; Gama et al., 2000).

1.2 Restrição Protéica

A desnutrição é um problema mundial, presente principalmente nos países subdesenvolvidos. Considerada uma doença, a desnutrição ou deficiência nutricional caracteriza-se pela deficiência crônica de um ou mais nutrientes (proteínas, vitaminas, carboidratos, entre outros) na alimentação do indivíduo (Monteiro, 2003). Para o crescimento e a manutenção das dimensões corporais é necessário que haja condições ótimas, principalmente quanto à ingestão e utilização biológica de calorias e proteínas (Hoffmann, 1995). A deficiência nutricional também está associada a outras patologias tais como infecções, diabetes e obesidade (Sawaya, 2006) e acomete principalmente crianças (0-4 anos), atingindo cerca de 10% das crianças no Brasil (Monteiro, 2003). Nos últimos anos, uma corrente de estudos tem sugerido que um déficit nutricional durante um período crítico e específico do desenvolvimento acarreta um efeito duradouro e persistente ao longo da vida do

indivíduo, que o predispõe a doenças como obesidade, diabetes e hipertensão. Tal efeito é denominado *imprinting* metabólico (Waterland e Giza, 1999).

Devido à sua gravidade, estudos têm utilizado modelos animais para investigar os efeitos do déficit nutricional no organismo, principalmente sobre a progênie. Diversas são as metodologias empregadas para desenvolver a desnutrição em filhotes: aumento do número de filhotes por mãe, diminuindo a quantidade de leite disponível aos filhotes; retirada dos filhotes da mãe lactente por um período do dia para deixá-los com uma fêmea não-lactente ou em uma incubadora. No entanto, os modelos experimentais mais utilizados são os que empregam um déficit energético e/ou protéico durante as fases pré e/ou pós-natal do animal, ou seja, é possível que o animal seja gerado e/ou amamentado por uma fêmea que recebeu uma dieta com quantidade restrita de ração ou apenas com restrição de proteínas (Crnic e Chase, 1978).

A redução protéica na dieta materna durante os períodos de gestação e/ou lactação promove diversas alterações no organismo da progênie. Filhotes com 21 dias de vida, cujas mães foram alimentadas com dieta restrita a 8% de proteína durante a prenhez e lactação ou apenas durante a lactação, apresentam redução de 50% na massa corpórea. Além disso, esses animais têm redução significativa na massa do estômago e no comprimento do intestino delgado em relação aos controles (Weaver et al., 1998). Entretanto, esses autores observaram que, com exceção da massa corpórea, tais efeitos são revertidos quando os animais recebem dieta com 20% de proteína após o desmame.

Segundo Desai et al. (1996), os órgãos têm sua massa afetada de uma maneira diferencial. Cérebro e pulmão, por exemplo, têm uma diminuição menor de massa (5%) do que órgãos como pâncreas e baço (30%) (Desai et al., 1996).

Dentre os estudos que abordaram os efeitos da restrição protéica sobre o trato gastrointestinal, o intestino teve maior enfoque, provavelmente devido à sua importante função absorptiva. Deo e Ramalingaswami (1965) observaram retardo na velocidade de migração celular (da cripta para o vilo) no intestino delgado de macacos que receberam uma dieta com restrição total de proteína. Em ratos, a ausência de proteína na dieta durante os períodos pré e pós-natal provoca redução do comprimento do intestino delgado e do número de neurônios mioentéricos nesse órgão (Gomes et al., 2006).

Ratos separados de sua mãe durante a transição para o desmame aos 17 dias de vida e submetidos à dieta de restrição protéica a 8% apresentaram redução da incorporação de timidina pelo intestino delgado e fígado aos 21 dias de idade, (Buts e Nyakabasa, 1985). Uma dieta de restrição protéica após o desmame até os 5 meses de idade pode desencadear aumento do número de apoptoses no vilo intestinal desses ratos (Bodiga et al., 2005).

Sabe-se que as enzimas intestinais sofrem maturação também durante o primeiro mês de vida pós-natal de ratos, coincidindo com a transição da dieta líquida para a dieta sólida (desmame). No entanto, quando ratos são submetidos à dieta de restrição protéica a 8% durante os períodos pré e pós-natal, verifica-se que ocorre atraso na maturação das enzimas intestinais, ou seja, aos 21 dias o animal apresenta altos níveis de lactase e baixos níveis de maltase e sucrase (Weaver, et al., 1998). Esse atraso na maturação das enzimas também foi observado em ratos que sofreram restrição alimentar a 50% durante a gestação e toda a lactação (Young et al., 1987).

Foram poucos os estudos que abordaram os efeitos da desnutrição protéica sobre a histofisiologia gástrica. Majumdar (1984) observou que ratos que sofreram desnutrição (por aumento do número de filhotes para cada mãe) desde o nascimento até o 14º dia de vida pós-natal apresentam retardo de crescimento e diminuição da concentração de gastrina antral, hormônio que, dentre suas diversas funções, estimula a secreção de ácido gástrico. Com a reversão do quadro nutricional, os órgãos recuperam sua massa, porém a concentração de gastrina ainda se mantém reduzida, com metade da quantidade normal (Majumdar, 1984). Por outro lado, Montoya, Leterme e Lalles (2006), que usaram como modelo de desnutrição animais adultos tratados com uma dieta ausente em proteína, embora não tenham avaliado os níveis de gastrina, observaram que os animais apresentavam pH muito baixo e esvaziamento acelerado do conteúdo gástrico, o que pode sugerir um aumento na secreção do hormônio.

Animais adultos que sofreram restrição protéica durante os períodos de gestação e lactação produzem maior quantidade de muco e prostaglandinas na mucosa gástrica. Assim, esse epitélio é menos afetado pela ulceração causada por ingestão elevada de etanol ou por administração de indometacina (Paula et al., 2005).

A regulação do crescimento de órgãos é um tema complexo e ainda em estudo. Há hormônios de ação geral sobre o organismo, como os hormônios tireoidianos, GH e fator de crescimento semelhante à insulina –1 (IGF-1); e outros de ação local, como fatores de crescimento. No epitélio gástrico, vários fatores de crescimento estão presentes desde o nascimento, enquanto outros chegam ao estômago por meio do leite e da saliva (Koldovský, 1989). O fator de crescimento transformante β (TGF- β) é um desses peptídeos e está presente no estômago desde o período fetal (De Andrade Sá et al., 2003). Entre suas funções, encontra-se a regulação local da proliferação celular (Alvares et al., 2007).

Em ratos com 21 dias de vida submetidos à dieta hipoprotéica, foi observado que níveis de IGF-1, hormônio muito importante para o crescimento do animal, sofrem redução de quase 90% em relação aos animais controle e essa redução é minimizada com a progressão da idade do animal. Desta forma, pode-se dizer que esse hormônio é dependente da quantidade de proteína na dieta e responde diferentemente de acordo com a idade do animal (Fliesen et al., 1989). A restrição protéica na dieta de ratos adultos também reduz os níveis séricos de IGF-1 (Oster et al., 1995). Em humanos com hábito alimentar vegetariano também ocorre redução dos níveis séricos desse hormônio (Fontana et al., 2008).

Filhotes nutridos por mães submetidas à dieta de restrição protéica durante o período de lactação apresentam aumento nas concentrações de hormônios tireoidianos (Passos et al., 2002) e diminuição da expressão de RNAm de GH durante o desenvolvimento (De Moura et al., 2007). A reabilitação nutricional não consegue reverter esse quadro e a expressão do GH permanece reduzida (De Moura et al., 2007). Esses resultados demonstram, particularmente, a importância de uma nutrição protéica balanceada, principalmente durante os períodos iniciais da vida do animal.

Até meados da década de 90, acreditava-se que a liberação de GH estava vinculada apenas à ação do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH) e da somatostatina (responsável pela inibição da liberação de GH). Recentemente, um novo hormônio foi descoberto, a ghrelina, cuja ação está intimamente ligada à liberação do GH (Kojima et al., 1999).

1.3 Ghrelina

A ghrelina é um peptídeo formado por 28 aminoácidos (Kojima et al., 1999) resultante de um processo pós-traducional pela ação da enzima pró-hormônio convertase 1/3 (PC1/3) a partir de uma proteína precursora denominada pró-ghrelina (Zhu et al., 2006). Constitui-se no primeiro peptídeo modificado por um ácido graxo e a presença de uma acilação na terceira serina (Ser-3) é fundamental para ativação de seu receptor (Kojima et al., 1999).

Esse hormônio liga-se ao receptor secretagogo do GH (GHS-R1a), que é um tipo de receptor acoplado à proteína G (GPCR) com sete domínios transmembrânicos (Smith et al., 1999). A ação do GHS-R1a se dá pela ativação da fosfolipase C, gerando inositol-trifosfato (IP3) e diacilglicerol, que resulta no aumento dos níveis intracelulares de cálcio, desencadeando respostas celulares específicas (Kojima et al., 1999).

A acilação (octanoilação) da Ser-3 ocorre principalmente no estômago pela ação da enzima ghrelina o-acil-transferase (GOAT) (Gutierrez et al., 2008). Assim sendo, as formas principais de ghrelina encontradas no rato são: não acilada (sem modificação pós-traducional) e acilada (modificada pós-tradução) (Hosoda et al., 2000). A forma acilada corresponde ao peptídeo ativo e a forma des-acilada é inativa, pois não se liga ao GHS-R (Hosoda et al., 2000). A forma des-acilada corresponde à maior parte da ghrelina encontrada no estômago (Hosoda et al., 2000).

O GHS-R1a é expresso na hipófise principalmente nas células somatotrofas hipofisárias do lobo anterior. Também é expresso no hipotálamo, na região do núcleo arqueado (ARC) (Nakazato et al., 2001; Camiña, 2006). Apesar da relevância da expressão do GHS-R1a nos tecidos neuroendócrinos, outros tecidos também apresentam expressão para esse receptor, tais como: pâncreas (Kageyama et al., 2005), estômago, intestino delgado e intestino grosso (Shuto et al., 2001; Dass et al., 2003).

A ghrelina é produzida predominantemente pelo estômago, mais especificamente pelas células endócrinas denominadas "X/A-like" (Date et al., 2000). Essas células estão presentes na região do colo e base da glândula oxíntica e raramente na região do antro-piloro de ratos e humanos, apresentam formato arredondado a ovóide, com grânulos citoplasmáticos elétron-densos e compactos e

podem também ser denominadas como células secretoras de ghrelina (Date et al., 2000). Em ratos, esse peptídeo é expresso principalmente na mucosa do estômago, com concentração diminuindo ao longo do intestino (Dornonville de La Cour et al., 2001; Lee et al., 2002).

Foram identificados dois tipos de células produtoras de ghrelina no trato gastrointestinal: células do “tipo fechado” e células do “tipo aberto”. No estômago, a maioria das células são do “tipo fechado”, e as células do “tipo aberto” aumentam progressivamente do estômago para o intestino (Dornonville de La Cour et al., 2001; Sakata et al., 2002; Zhao e Sakai, 2008). As células do “tipo fechado” não apresentam contato com o lúmen glandular e recebem estímulo hormonal, neuronal ou por distensão mecânica. Já as células do “tipo aberto”, têm contato luminal, e são reguladas por nutrientes ou pH (Solcia et al., 2000). Desta forma, pode-se observar que as células produtoras de ghrelina podem ser reguladas por diferentes estímulos e desempenhar diversos papéis fisiológicos.

Células positivas para ghrelina podem ser visualizadas na mucosa gástrica de ratos a partir do 21º dia de vida fetal e a concentração dessas células aumenta progressivamente durante a segunda e terceira semanas de vida pós-natal (Hayashida et al., 2002; Walia et al., 2009).

Além do estômago, intestino delgado e intestino grosso, diversos outros órgãos tais como pâncreas, rins, hipófise e testículo são capazes de sintetizar ghrelina, porém em concentrações bem menores (Rindi et al., 2004; Yabuki et al., 2006). A gastrectomia reduz cerca de 80% da concentração plasmática de ghrelina (Dornonville de La Cour et al., 2005). No entanto, após a cirurgia essa concentração aumenta gradualmente, possivelmente devido à produção compensatória desse hormônio por outros órgãos, como o duodeno (Wang et al., 2008).

A ghrelina foi caracterizada, primeiramente, como sendo um hormônio liberador de GH por uma via independente do GHRH hipotalâmico (Kojima et al., 1999), ou seja, esse peptídeo estimula a liberação de GH pela hipófise, tanto *in vivo* como *in vitro* (Wren et al., 2000; Arvat et al., 2001).

Toshinai et al. (2001) demonstraram que o jejum alimentar leva ao aumento dos níveis plasmáticos de ghrelina e sua conseqüente redução no estômago. Com a realimentação, os níveis plasmáticos de ghrelina sofrem redução, e no estômago voltam às concentrações normais, sugerindo que a ghrelina é secretada do estômago para a corrente sanguínea em resposta ao jejum. Desta forma, a ghrelina

também é responsável pelo aumento do apetite (peptídeo orexigênico) (Wren et al., 2000; Nakazato et al., 2001; Toshinai et al., 2001).

No núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, uma região relacionada à regulação do apetite, Kojima et al. (1999) relataram a existência de neurônios que expressam ghrelina. O ARC é crítico para a regulação da alimentação e massa corporal, pois contém neuropeptídeos orexigênicos como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína *agouti* (AgRP). A ghrelina, que atua como um antagonista da leptina (hormônio supressor do apetite), estimula a expressão do RNAm de NPY induzindo o aumento do consumo de alimentos (Nakazato et al., 2001).

As informações sobre o estado nutricional do indivíduo chegam aos neurônios do ARC através da corrente sanguínea (Nakazato et al., 2001), com o aumento dos níveis plasmáticos de ghrelina antes de cada refeição e redução a níveis mínimos uma hora depois. Ao agir como um sinal da fome, a ghrelina contribui para regulação da homeostase energética (Cummings et al., 2001).

Essa resposta de regulação do apetite pode ser encontrada desde o início da vida pós-natal. Ratos lactentes com uma semana de vida submetidos ao jejum por oito horas apresentam redução da concentração de ghrelina no estômago e aumento de sua concentração plasmática (Hayashida et al., 2002).

A ghrelina também tem a capacidade de modular a proliferação de diversas linhagens celulares como células hipofisárias e osteoblastos (Nanzer et al., 2004; Maccarinelli et al., 2005), aumenta a motilidade gástrica e a secreção de ácido gástrico (Masuda et al., 2000), estimula a formação óssea (Fukushima et al., 2005), tem ação anti-inflamatória (Dixit e Taub, 2005), reduz a pressão arterial (Nagaya et al., 2001). Além dessas diversas funções, foi observado que a administração de ghrelina reduz a apoptose na mucosa intestinal de ratos submetidos ao jejum (Park et al., 2008) e também inibe a apoptose em linhagens de célula de cardiomiócitos e células endoteliais, agindo como um protetor desses tecidos (Baldanzi et al., 2002).

Tschöp et al. (2000) observaram que a administração de ghrelina leva a alterações metabólicas, resultando no aumento da massa corpórea e redução da utilização de gordura, além disso esse hormônio estimula a adipogênese (Choi et al., 2003). A administração subcutânea diária de ghrelina em ratas grávidas, do 15º ao 21º dia de gestação resulta no aumento da massa corporal de ratos recém-nascidos (Hayashida et al., 2002).

Em indivíduos obesos a concentração de ghrelina plasmática é reduzida (Tschöp et al., 2001), enquanto em pacientes com anorexia nervosa ou bulimia esses níveis encontram-se elevados (Tanaka et al., 2002; Janas-Kozik et al., 2007), possivelmente numa tentativa de reequilibrar a homeostase energética.

O nível de glicose no sangue também influencia a regulação da ghrelina. Quando a glicose é administrada oral ou intravenosamente, a concentração de ghrelina plasmática diminui (Shiia et al., 2002). Em caso de hipoglicemia induzida pela insulina, foi observado que houve aumento da expressão de RNAm de ghrelina no fundo gástrico, sugerindo que a ghrelina provavelmente deve agir como uma molécula de sinal anabólico durante uma depleção energética (Toshinai et al., 2001).

Ratos adultos que receberam dieta com grande quantidade de gordura apresentam redução dos níveis plasmáticos e da expressão de RNAm para ghrelina no estômago, enquanto animais que tiveram alimentação com baixo teor protéico apresentam expressão e níveis plasmáticos elevados de ghrelina (Lee et al., 2002).

A ghrelina está profundamente envolvida em diversos processos fisiológicos, sendo fundamental na regulação do consumo alimentar, conectando o eixo cérebro-estômago com a finalidade de alcançar a homeostase energética.

7 CONCLUSÕES

A restrição protéica durante os períodos pré e pós-natal reduz o crescimento e a proliferação celular no epitélio gástrico, enfatizando a importância do consumo de quantidade adequada de proteína durante o desenvolvimento do animal.

Concluimos também que há uma evidente diferença na resposta hormonal entre animais lactentes e desmamados, uma vez que a presença de ghrelina nas células gástricas e seus níveis séricos não sofrem alteração com a dieta aos 14 dias, mas são significativamente aumentados nos ratos de 30 e 50 dias.

O aumento na expressão e nos níveis plasmáticos de ghrelina induzido pela dieta de restrição protéica por um longo período pode ser uma estratégia adaptativa de sobrevivência em resposta à diminuição da massa corpórea destes animais.

REFERÊNCIAS¹

Aherne WA, Camplejohn RS, Wright NA. An introduction to cell population kinetics. London: Edward Arnold; 1977. 96 p.

Alvares EP, Gama P. Fasting enhances cell proliferation of gastric epithelium during the suckling period in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26:869-73.

Alvares EP, Jordão LR, Gama P. Differential distribution of transforming growth factor beta and receptors in the hyper or hypoproliferative gastric mucosa of developing and adult rats. *Histol Histopathol.* 2007;22:147-53.

Alvares EP. Circadian rhythms of mitotic activity in gastric mucosa of feedind and fasting rats. *Prog Clin Biol Res.* 1987;227A:353-60.

Alvares EP. The effect of fasting on cell proliferation in the gastric mucosa of the 14-day-old suckling rat. *Braz J Med Biol Res.* 1992;25:641-9.

Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparision and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1169-74.

Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol.* 2002;159(6):1029-37.

Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res.* 2008;63(4):358-63.

Bodiga VL, Boindala S, Putcha U, Subramaniam K, Manchala R. Chronic low intake of protein or vitamins increases the intestinal epithelial cell apoptosis in Wistar/NIN rats. *Nutrition.* 2005;21(9):949-60.

Bonjour JP, Ammann P, Chevalley T, Rizzoli R. Protein intake and bone growth. *Can J Appl Physiol.* 2001;26 Suppl:S153-66.

Borelli P, Barros FE, Nakajima K, Blatt SL, Beutler B, Pereira J, Tsujita M, Favero GM, Fock RA. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(6):523-30.

¹ **De acordo com:**

International Committee of Medical journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003- Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Buts JP, Nyakabasa M. Role of dietary protein adaptation at weaning in the development of the rat gastrointestinal tract. *Pediatr Res*. 1985;19:857-62.

Camiña JP. Cell biology of the ghrelin receptor. *J Neuroendocrinol*. 2006;18:65-76.
Chen JC, Tonkiss J, Galler JR, Volicer L. Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. *J Nutr*. 1992;122(11):2138-43.

Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S. The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*. 2003;144(3):754-9.

Crnic LS, Chase HP. Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. *J Nutr*. 1978;108(11):1755-60.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001;50:1714-9.

Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, Sanger GJ. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience*. 2003;120(2):443-53.

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000;141:4255-61.

De Andrade Sá ER, Bitencourt B, Alvares EP, Gama P. In vivo effects of TGFbeta1 on the growth of gastric epithelium in suckling rats. *Regul Pept*. 2008;146:293-302.

De Andrade Sá ER, Jordão LR, Takahashi CA, Alvares EP, Gama P. Ontogenic expression of TGFbeta 1, 2, and 3 and its receptors in the rat gastric mucosa. *Dev Dyn*. 2003;227:450-7.

De Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, Souza KP, Passos MCF. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem*. 2007;18:134-9.

Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Bielanski W, Cieszkowski J, Dembinski M, Pawlik WW, Kuwahara A, Kato I, Konturek PC. Variable effect of ghrelin administration on pancreatic development in young rats. Role of insulin-like growth factor-1. *J Physiol Pharmacol*. 2005;56:555-70.

Deo MG, Ramalingaswami V. Reaction of the small intestine to induced protein malnutrition in Rhesus monkeys. A study of cell population kinetics in the jejunum. *Gastroenterology*. 1965;49:150-7.

Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr*. 1996;76:591-603.

Dixit VD, Taub DD. Ghrelin and immunity: a young player in an old field. *Exp Gerontol*. 2005;40(11):900-10.

Dornonville de la Cour C, Björkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Håkanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept*. 2001;99:141-50.

Dornonville de la Cour C, Lindqvist A, Egecioglu E, Tung YC, Surve V, Ohlsson C, Jansson JO, Erlanson-Albertsson C, Dickson SL, Håkanson R. Ghrelin treatment reverses the reduction in weight gain and body fat in gastrectomised mice. *Gut*. 2005;54:907-13.

Du F, Higginbotham A, White BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr*. 2000;130:514-21.

El-Hodhod MA, Emam EK, Zeitoun YA, El-Araby AM. Serum ghrelin in infants with protein-energy malnutrition. *Clin Nutr*. 2009;28(2):173-7.

Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2007;98:922-8.

Faria TS, Ramos CF, Sampaio FGB. Puberty onset in the female of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J Nutr Biochem*. 2004;15:123-7.

Fernandes RM, Abreu AV, Silva RB, Silva DF, Martinez GL, Babinski MA, Ramos CF. Maternal malnutrition during lactation reduces skull growth in weaned rat pups: experimental and morphometric investigation. *Anat Sci Int*. 2008;83(3):123-30.

Ferreira CL, Macêdo GM, Latorraca MQ, Arantes VC, Veloso RV, Carneiro EM, Boschero AC, Nascimento CM, Gaíva MH. Serum leptin and insulin levels in lactating protein-restricted rats: implications for energy balance. *Br J Nutr*. 2007;97:27-34.

Fliesen T, Maiter D, Gerard G, Underwood LE, Maes M, Ketelslegers JM. Reduction of serum insulin-like growth factor-I by dietary protein restriction is age dependent. *Pediatr Res*. 1989;26(5):415-9.

Florêncio TM, Ferreira HS, De França AP, Cavalcante JC, Sawaya AL. Obesity and undernutrition in a very-low-income population in the city of Maceió, northeastern Brazil. *Br J Nutr*. 2001;86:277-84.

Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging Cell*. 2008;7(5):681-7.

Fortman JK 2nd, Reichling T, German RZ. The impact of maternal protein malnutrition on pre-weaning skeletal and visceral organ growth in neonatal offspring of *Rattus norvegicus*. *Growth Dev Aging*. 2005;69(1):39-52.

Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res.* 2005;20(5):790-8.

Furihata C, Kawachi T, Sugimura T. Premature induction of pepsinogen in developing rat gastric mucosa by hormones. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972;47(4):705-11.

Gama P, Alvares EP. Corticosterone treatment inhibits cell proliferation of the gastric epithelium of suckling rats. *J Gastroenterol.* 1998;33:32-8.

Gama P, Alvares EP. Early weaning and prolonged nursing induce changes in cell proliferation in the gastric epithelium of developing rats. *J Nutr.* 2000;130:2594-8.

Gama P, Alvares EP. LHRH and somatostatin effects on the cell proliferation of the gastric epithelium of suckling and weaning rats. *Regul Pept.* 1996;63:73-8.

Gama P, Goldfeder EM, de Moraes JC, Alvares EP. Cell proliferation and death in the gastric epithelium of developing rats after glucocorticoid treatments. *Anat Rec.* 2000;260(3):213-21.

Goldfeder EM, Alvares EP. Effects of somatostatina, LHRH and TGF- α on epithelial cell proliferation in fetal stomach maintained in organ culture. *Braz J Morphol Sci.* 2001;18(1):21-8.

Gomes OA, Castelucci P, de Vasconcellos Fontes RB, Liberti EA. Effects of pre-and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: a quantitative morphological study. *Auton Neurosci.* 2006;126-127:277-84.

Gómez JL, Campos C, Rangel P, Ortiz R. Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. *Mutat Res.* 1996;352:57-60.

Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982;218:474-5.

Grigor MR, Allan JE, Carrington JM, Carne A, Geursen A, Young D, Thompson MP, Haynes EB, Coleman RA. Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats. *J Nutr.* 1987;117(7):1247-58.

Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(17):6320-5.

Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Murakami N. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol.* 2002;173:239-45.

Helander HF. The cells of the gastric mucosa. *Int Rev Cytol.* 1981;70:217-89.

Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol.* 1981;241:199-214.

Himes RH, Kersey RN, Heller-Bettinger I, Samson FE. Action of the vinca alkaloids vincristine, vinblastine, and desacetyl vinblastine amide on microtubules in vitro. *Cancer Res.* 1976;36(10):3798-802.

Hoffmann R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. *Estudos Avançados.* 1995;9(24):159-72.

Hormi K, Onolfo JP, Gres L, Lebraud V, Lehy T. Developmental expression of transforming growth factor-alpha in the upper digestive tract and pancreas of the rat. *Regul Pept.* 1995;55:67-77.

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(3):909-13.

Houpt KA, Epstein AN. Ontogeny of controls of food intake in the rat: GI fill and glucoprivation. *Am J Physiol.* 1973;225:58-66.

Ikezaki M, Johnson LR. Development of sensitivity to different secretagogues in the rat stomach. *Am J Physiol.* 1983;244(2):165-70.

Janas-Kozik M, Krupka-Matuszczyk I, Malinowska-Kolodziej I, Lewin-Kowalik J. Total ghrelin plasma level in patients with the restrictive type of anorexia nervosa. *Regul Pept.* 2007;140:43-6.

Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, Ericsson A, Palmberg I, Tranberg M, Ganapathy V, Powell TL, Jansson T. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol.* 2006;576(Pt 3):935-46.

Johnson LR. Functional development of the stomach. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:199-215.

Johnson LR. Regulation: Peptides of the gastrointestinal tract. In: Johnson LR, editor. *Gastrointestinal physiology.* Saint Louis: Mosby, 1997. p. 7-9.

Kageyama H, Funahashi H, Hirayama M, Takenoya F, Kita T, Kato S, Sakurai J, Lee EY, Inoue S, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shioda S. Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regul Pept.* 2005;126:67-71.

Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:288-306.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. *Anat Rec.* 1993a;236:297-313.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cells and pinpointing of the stem cells. *Anat Rec.* 1993;236:259-79.

Kataoka K, Sakano Y, Miura J. Histogenesis of the mouse gastric mucosa, with special reference to type and distribution of proliferative cells. *Arch Histol Jpn.* 1984;47(5):459-74.

Kedinger M, Duluci I, Fritsch C, Lorentz O, Plateroti M, Freund JN. Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;17:1-17.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402:656-60.

Koldovský O. Hormones in milk. *Life Sci.* 1980;26(22):1833-6.

Koldovský O. Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. *J Nutr.* 1989;119:1543-51.

Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology.* 2008;135(1):41-60.

Langley-Evans SC, Sculley DV. The association between birthweight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. *FEBS Lett.* 2006;580(17):4150-3.

Lee ER, Trasler J, Dwivedi S, Leblond CP. Division of the mouse gastric mucosa into zymogenic and mucous regions on the basis of gland features. *Am J Anat.* 1982;164:187-207.

Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology.* 2002;143:185-90.

Lee PC, Lebenthal E. Early weaning and precocious development of small intestine in rats: genetic, dietary or hormonal control. *Pediatr Res.* 1983;17:645-50.

Ling PR, Bistrian BR. Comparison of the effects of food versus protein restriction on selected nutritional and inflammatory markers in rats. *Metabolism.* 2009;58:835-42.

Maccarinelli G, Sibilia V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D. Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol.* 2005;184(1):249-56.

Maiter D, Fliesen T, Underwood LE, Maes M, Gerard G, Davenport ML, Ketelslegers JM. Dietary protein restriction decreases insulin-like growth factor I independent of insulin and liver growth hormone binding. *Endocrinology.* 1989;124(5):2604-11.

Majumdar AP. Postnatal undernutrition: effect of epidermal growth factor on growth and function of the gastrointestinal tract in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1984;3:618-25.

Marín MC, De Tomás ME, Serres C, Mercuri O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr.* 1995;125(4):1017-24.

Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(3):905-8.

Monteiro CA. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estudos Avançados.* 2003;17(48):7-13.

Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5854-9.

Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Kaiya H, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology.* 2006;147:1333-42.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001;409:194-8.

Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonits M. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(2):233-40.

Orozco-Sólis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav.* 2009;96(3):481-92.

Oster MH, Fielder PJ, Levin N, Cronin MJ. Adaptation of the growth hormone and insuline-like growth factor-I axis to chronic and severe calorie or protein malnutrition. *J Clin Invest.* 1995;95:2258-65.

Park JM, Kakimoto T, Kuroki T, Shiraishi R, Fujise T, Iwakiri R, Fujimoto K. Suppression of intestinal mucosal apoptosis by ghrelin in fasting rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(1):48-56.

Passos MC, Da Fonte Ramos C, Dutra SC, Mouço T, de Moura EG. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res.* 2002;34:40-3.

Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res.* 2000;20(11):1603-12.

Paula AC, Gracioso JS, Toma W, Bezerra R, Saad MA, De Lucca IM, Carneiro EM, Souza Brito AR. Is gastric ulceration different in normal and malnourished rats? *Br J Nutr.* 2005;93(1):47-52.

Peitsch W, Takeuchi K, Johnson LR. Mucosal gastrin receptor. VI. Induction by corticosterone in newborn rats. *Am J Physiol.* 1981;240(6):442-9.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123:1939-51.

Reichling TD, German RZ. Bones, muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*Rattus norvegicus*) grow more slowly but for longer durations to reach normal final size. *J Nutr.* 2000;130(9):2326-32.

Rindi G, Torsello A, Locatelli V, Solcia E. Ghrelin expression and actions: a novel peptide for an old cell type of the diffuse endocrine system. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229(10):1007-16.

Riul TR, Carvalho AF, Almeida PS, De-Oliveira LM, Almeida SS. Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32:975-83.

Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides.* 2002;23(3):531-6.

Sawaya AL, Dallal G, Solymos G, de Sousa MH, Ventura ML, Roberts SB, Sigulem DM. Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of São Paulo, Brazil. *Obes Res.* 1995;3 Suppl 2:107-15.

Sawaya AL. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estudos avançados.* 2006;20(58):147-58.

Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K, Gomita Y. Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides.* 2004;25:279-87.

Shiyya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(1):240-4.

Shrader RE, Zeman FJ. Effect of maternal protein deprivation on morphological and enzymatic development of neonatal rat tissue. *J Nutr.* 1969;99(4):401-12.

Shuto Y, Shibasaki T, Wada K, Parhar I, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone

secretagogue receptor (GHS-R): evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life Sci.* 2001;68(9):991-6.

Simões C. Proliferação, diferenciação, maturação e migração de populações celulares do epitélio gástrico do rato durante o primeiro mês de vida [tese (Doutorado em Histologia e Embriologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1992.

Smith RG, Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, Yang L, Morriello G, Nargund R, Patchett AA, Howard AD. Growth hormone releasing substances: types and their receptors. *Horm Res.* 1999;51 Suppl 3:1-8.

Solcia E, Rindi G, Buffa R, Fiocca R, Capella C. Gastric endocrine cells: types, function and growth. *Regul Pept.* 2000;93(1-3):31-5.

Souza SL, Orozco-Solis R, Grit I, de Castro RM, Bolaños-Jiménez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci.* 2008;27:1400-08.

Syme G. The effect of protein-deficient isoenergetic diets on the growth of rat jejuna mucosa. *Br J Nutr.* 1982;48:25-36.

Takeuchi K, Peitsch W, Johnson LR. Mucosal gastrin receptor. V. Development in newborn rats. *Am J Physiol.* 1981;240:163-9.

Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S. Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol.* 2002;146(6):1-3.

Teixeira CV, Passos MCF, Ramos CF, Dutra SCP, De Moura EG. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem.* 2002;13:493-8.

Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281:1220-5.

Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000;407:908-13.

Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest.* 2001;24(6):19-21.

Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* 2001;50:707-9.

Vicente LL, de Moura EG, Lisboa PC, Monte Alto Costa A, Amadeu T, Mandarim-de-Lacerda CA, Passos MC. Malnutrition during lactation in rats is associated with

higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. *Nutrition*. 2004;20(10):924-8.

Walia P, Asadi A, Kieffer TJ, Johnson JD, Chanoine JP. Ontogeny of ghrelin, obestatin, preproghrelin, and prohormone convertases in rat pancreas and stomach. *Pediatr Res*. 2009;65(1):39-44.

Warzecha Z, Dembiński A, Ceranowicz P, Dembiński M, Cieszkowski J, Bielański W, Pawlik WW, Kuwahara A, Kato I. Dual age-dependent effect of ghrelin administration on serum level of insulin-like growth factor-1 and gastric growth in young rats. *Eur J Pharmacol*. 2006;529(1-3):145-50.

Warzecha Z, Dembiński A, Ceranowicz P, Dembiński M, Cieszkowski J, Konturek SJ, Polus A, Pawlik WW, Kuwahara A, Kato I, Konturek PC. Influence of ghrelin on gastric and duodenal growth and expression of digestive enzymes in young mature rats. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57(3):425-37.

Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(2):179-97.

Weaver LT, Desai M, Austin S, Arthur HM, Lucas A, Hales CN. Effects of protein restriction in early life on growth and function of the gastrointestinal tract of the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998;27:553-9.

White BD, He B, Dean RG, Martin RJ. Low protein diets increase neuropeptide Y gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *J Nutr*. 1998;124:1152-60.

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2000;141:4325-8.

Wykes LJ, Fiorotto M, Burrin DG, Del Rosario M, Frazer ME, Pond WG, Jahoor F. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. *J Nutr*. 1996;126(5):1481-8.

Yabuki A, Taharaguchi S, Ichii O, Kojima M, Nishi Y, Mifune H, Kamimura R, Matsumoto M, Suzuki S. Immunohistochemical localization of ghrelin in rodent kidneys. *Histochem Cell Biol*. 2006;126(2):231-8.

Zhao Z, Sakai T. Characteristic features of ghrelin cells in the gastrointestinal tract and the regulation of stomach ghrelin expression and production. *World J Gastroenterol*. 2008;14(41):6306-11.

Zhu X, Cao Y, Voogd K, Steiner DF. On the processing of proghrelin to ghrelin. *J Biol Chem*. 2006;281(50):38867-70.