NATÁLIA MARTINS BITTAR-RODRIGUES

DISTRIBUIÇÃO DA GHRELINA E DE SEU RECEPTOR NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE: EFEITOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EPITELIAL

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. Patrícia Gama.

Versão original.

São Paulo
2012

RESUMO

Bittar-Rodrigues NM. Distribuição da ghrelina e de seu receptor na mucosa gástrica de ratos submetidos ao desmame precoce: efeitos sobre a proliferação celular epitelial. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

O leite materno, fonte exclusiva de nutrientes durante a lactação, contém hormônios e fatores de crescimento capazes de estimular a maturação, o desenvolvimento funcional e o crescimento do trato gastrintestinal. O desmame é a transição do aleitamento para a ingestão de alimento sólido e representa um período importante para o desenvolvimento do animal. O desmame precoce, caracterizado pela interrupção abrupta do aleitamento, provoca uma série de alterações na mucosa do estômago, órgão que é o principal local de síntese da ghrelina, um hormônio relacionado com a ingestão de alimentos e metabolismo. No presente trabalho, investigamos a distribuição de ghrelina e de seu receptor (GHS-R) na mucosa gástrica de ratos durante a terceira semana de vida pós-natal e avaliamos o efeito do desmame precoce sobre estas moléculas. Estudamos também a participação da ghrelina no controle da proliferação celular do epitélio gástrico, e para tanto utilizamos a administração de um antagonista. Por meio de imuno-histoquímica, detectamos o aumento do número de células imunomarcadas para ghrelina nos animais desmamados precocemente. Com o uso da técnica de RT-PCR, observamos que a expressão de *GHS-R* não foi alterada pela mudança da dieta e, após a realização de *Western blot* confirmamos que a concentração do receptor na mucosa gástrica também não foi modificada. O uso do antagonista [D-Lys-3]-GHRP-6 resultou na diminuição do índice de síntese de DNA no epitélio gástrico, avaliado por meio de imuno-histoquímica para BrdU. Concluímos que a ghrelina e o GHS-R estão distribuídos no estômago durante a terceira semana de vida pós-natal e que o desmame precoce aumenta os níveis de ghrelina no epitélio gástrico, sem comprometer seu receptor. Por fim, sugerimos que esta modulação pode estar envolvida no controle da proliferação celular que é fundamental para o desenvolvimento do estômago.

Palavras-chave: Estômago. Ghrelina. Amamentação. Receptor secretagogo do hormônio de crescimento. Desmame precoce. Desenvolvimento pós-natal.

ABSTRACT

Bittar-Rodrigues NM. Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor distribution in the gastric mucosa of early weaned rats: effects on epithelial cell proliferation. [Masters thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Maternal milk is the exclusive source of nutrients during lactation and carries hormones and growth factors that promote maturation, functional development and growth of the gastrointestinal tract. Weaning marks the transition from suckling to solid food intake and it is important for appropriate postnatal development. Early weaning is the abrupt interruption of suckling, and induces several effects in stomach, which is the major site of ghrelin synthesis, a hormone that induces food intake and is related to metabolism control. In the present study, we investigated the distribution of ghrelin and growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) in the rat gastric mucosa during the third postnatal week, and evaluated the effects of early weaning on these molecules. In addition, we studied whether ghrelin is part of cell proliferation control in gastric epithelium, and to that we used an antagonist. By using immunohistochemistry, we detected an increase of ghrelin immunolabelled cells in animals submitted to early weaning. After RT-PCR, we observed that *GHS-R* expression was not altered by dietary change and this result was confirmed through Western blot, whereby we observed receptor levels. The antagonist [D-Lys-3]-GHRP-6 reduced DNA synthesis index, as determined by BrdU incorporation followed by immunohistochemistry. We concluded that ghrelin and GHS-R are distributed in the gastric mucosa during the third postnatal week and that early weaning increases hormone levels in the gastric epithelium, without changing its receptor. We can suggest that such modulation might be involved in the control of cell proliferation, which is essential for stomach development.

Keywords: Stomach. Ghrelin. Suckling. Growth hormone secretagogue receptor. Early weaning. Postnatal development.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Amamentação e desmame precoce

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (World Health Organization, 2002) preconiza que "a amamentação é uma maneira inigualável de fornecer alimento ideal para o crescimento e o desenvolvimento saudáveis das crianças [...]".

A amamentação exclusiva até os seis meses de idade assegura benefícios tanto à criança, quanto à mãe, sendo o principal benefício à saúde das crianças observado em curto prazo: a redução da mortalidade e da morbidade por doenças infecciosas. Assim, a OMS recomenda o aleitamento materno exclusivo até os seis primeiros meses de idade, quando se inicia a introdução da alimentação complementar, porém sem a suspensão do aleitamento por completo, que deve prosseguir até dois anos de idade ou mais (Horta et al., 2007; WHO, 2001).

A percepção de que a exposição a determinadas condições nos primeiros anos de vida, incluindo-se o padrão nutricional da criança, pode gerar efeitos observados na vida adulta, deu origem à ideia de "programação", ou seja, "[...] um processo no qual um estímulo aplicado em um período crítico ou sensível do desenvolvimento, resulta em um efeito de longo prazo ou permanente na estrutura ou função do organismo [...]" (Horta et al., 2007).

Em um estudo de meta-análise, Harder et al. (2005) concluíram que há uma associação dose-dependente entre o prolongamento do período de lactação e a diminuição do risco para obesidade na vida adulta, o que fortalece a hipótese de que a programação dos mecanismos de sinalização de fome e saciedade ocorre no período neonatal, podendo influenciar tanto o apetite quanto o consumo de alimentos na vida adulta (Cripps et al., 2005). Um estudo da OMS reforçou esta ideia ao apontar que o aleitamento pode ter efeitos benéficos de longo prazo, visto que indivíduos amamentados apresentaram na vida adulta: redução de colesterol total e de pressão arterial, diminuição da incidência de diabetes tipo 2, menor prevalência de sobrepeso e obesidade, além de uma melhor performance em testes de inteligência frente a indivíduos que não foram amamentados (Horta et al., 2007).

Entretanto, todos esses benefícios são colocados em risco quando se nota que a prevalência de aleitamento materno exclusivo é de apenas 41% nas crianças menores de seis meses, como revelado por um levantamento conduzido nas capitais brasileiras e Distrito Federal em 2008. Deve-se ressaltar a variação observada entre as regiões do país: 45,9% para a região Norte, 45% no Centro-Oeste, 43,9% no Sul, 39,4% no Sudeste e 37% no Nordeste. O

tempo de duração do aleitamento materno exclusivo também merece destaque, sendo em média de 54,11 dias, ou seja, 1,8 meses para as capitais brasileiras, muito abaixo do tempo mínimo preconizado para a lactação exclusiva (Brasil, 2009).

Dentre todas as espécies de mamíferos, os filhos / filhotes apresentam alto grau de dependência para com suas mães, tanto para a nutrição propriamente dita, que se traduz na lactação, quanto para suprir as necessidades de interação física. Assim, a interrupção da relação entre mãe e filho / filhote resulta não somente em alterações fisiológicas, mas também em modificações comportamentais (Kikusui e Mori, 2009).

O desmame precoce reflete a curta duração do aleitamento materno exclusivo e a abrupta separação dos filhotes da mãe, além da transferência não gradativa da fonte de nutrientes, com a súbita introdução de ração no lugar do leite materno.

Estudos realizados com roedores desmamados precocemente relatam alterações comportamentais como o aumento persistente da sensação de medo e da sensibilidade a fatores de estresse. Nestes casos, ocorre inclusive uma exacerbação da resposta neuroendócrina, causada possivelmente por uma redução do número de receptores de glicocorticoides da região do hipocampo (Kikusui e Mori, 2009). O desmame precoce também afeta o quanto de cuidado maternal as fêmeas que foram submetidas a esse processo vão dedicar a seus filhotes na vida adulta, visto que elas mesmas tiveram acesso restrito a esse tipo de cuidado (Kikusui e Mori, 2009).

Seguindo-se uma linha temporal no que se refere à alimentação dos ratos, sabe-se que durante o período gestacional a nutrição ocorre por via placentária e, a partir do nascimento, se dá a amamentação. A partir do 14º dia de vida pós-natal, os ratos abrem os olhos e passam a reconhecer o ambiente e a identificar a ração como um novo alimento. Inicia-se então um período de transição, no qual a dieta torna-se mista, com o consumo de alimento sólido associado ao leite materno. Esta condição permanece até o desmame definitivo que, naturalmente ocorre aos 28 dias de vida, mas para fins experimentais, é induzido no 21º dia pós-natal (Henning, 1981).

Dessa forma, o período de desmame compreende a substituição gradativa do leite materno pelo alimento sólido e é concomitante a outros processos fisiológicos relacionados à alteração do padrão de dieta. Nessa fase ocorre uma mudança na proporção de macronutrientes ingeridos, com aumento no consumo de carboidratos e decréscimo da quantidade de lípides, o que desencadeia também a alteração do quadro de enzimas digestórias. Paralelamente ao desmame, ocorrem também o desenvolvimento do paladar, a

maturação morfológica da língua, a abertura das orelhas e a regulação termogênica (Henning, 1981; Koldovský, 1985).

Além de fonte de nutrientes, o leite materno também é composto por diversos peptídeos biologicamente ativos, como hormônios e fatores de crescimento, capazes de estimular o crescimento do trato gastrintestinal e sua maturação funcional (Donovan e Odle, 1994; Koldovský, 1989; Koldovský et al., 1995; Xu, 1996), já que o animal neonato necessita de um período até que seja capaz de sintetizar seus próprios hormônios e fatores de crescimento em concentrações adequadas para exercerem suas funções (Gama e Alvares, 1996; Penttila et al., 1998; Smith e Ojeda, 1984).

Dada a importância das fases de lactação e desmame, visto que a ingestão do leite materno não só nutre os filhotes, mas seus peptídeos biologicamente ativos têm funções fundamentais ao desenvolvimento adequado dos mesmos, perturbações do padrão alimentar durante esse período podem interferir no desenvolvimento dos animais (Koldovský, 1985).

Lima et al. (2011) utilizaram um modelo de desmame precoce aos 17 dias sem separação materna, mas com impedimento de acesso à amamentação por bloqueio mecânico, e mostraram os seguintes efeitos na vida adulta: aumento de peso corporal e adiposidade visceral, hipertrigliceridemia, hiperglicemia com sinais de resistência insulínica e hiperleptinemia associada à resistência hipotalâmica a esse hormônio, caracterizando um quadro de desenvolvimento de síndrome metabólica.

Sabe-se que modificações da condição alimentar alteram o processo proliferativo da mucosa gástrica, de forma que em animais lactentes ocorre um estímulo durante o jejum (Alvares, 1992; Alvares e Gama, 1993). Em animais jovens, aos 30 dias, há inibição da proliferação nesta situação, enquanto animais de 22 dias não são responsivos à privação alimentar. Pode-se então inferir que há uma relação entre a fase de desenvolvimento do animal e o tipo de resposta proliferativa que a condição alimentar provoca (Alvares e Gama, 1993).

A drástica mudança representada pelo desmame precoce estressa os filhotes (Figueiredo, 2010; Lin et al., 1998), aumenta em cinco vezes a incidência de erosões gástricas (Ackerman et al., 1978) e a predisposição à ocorrência de lesões ulcerativas mais profundas (Glavin e Pare, 1985). Alterações nas funções digestivas e proliferativas também decorrem do desmame precoce, como mostrado por Gama e Alvares (2000), que verificaram que há inibição da proliferação celular no estômago quando filhotes submetidos a esse padrão são mantidos em jejum, sugerindo que esta mudança da dieta leva ao surgimento de uma resposta típica de outra fase da vida do animal.

Lin et al. (2001) demonstraram que o desmame precoce também eleva a atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC), além de induzir a atividade do pepsinogênio, indicando a aceleração do desenvolvimento funcional gástrico. Outros estudos revelaram que a antecipação da substituição do leite pelo alimento sólido promove a diferenciação de células mucosas do colo, consideradas marcadoras da maturação do estômago, assim como causa um aumento dos níveis do fator de crescimento transformante α (TGFα) e do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) no epitélio gástrico (Osaki et al., 2010).

Além do TGFα, o fator de crescimento transformante β (TGFβ) também é susceptível às alterações impostas pela dieta do animal e por sua condição alimentar. Alvares et al. (2007) mostraram que animais lactentes sob efeito de jejum apresentam redução dos níveis da isoforma TGFβ3, fato confirmado por Ogias et al. (2010), que também relataram diminuição nos níveis do receptor-I (TβRI) de TGFβ na mesma condição. Entretanto, durante o desmame precoce, a privação alimentar aumenta os níveis de TGFβ3 e TβRI na mucosa gástrica (Ogias et al., 2010).

Assim, os efeitos já conhecidos do desmame precoce permitem inferir que o leite materno age como um fator modulador da proliferação celular na mucosa gástrica, bem como de seu desenvolvimento funcional (Gama e Alvares, 2000; Lin et al., 2001; Ogias et al., 2010; Osaki et al., 2010, 2011), atuando em conjunto com peptídeos biologicamente ativos nele contido (De Andrade Sá et al., 2008; Gama e Alvares, 1996).

1.2 Estômago

O estômago caracteriza-se como uma dilatação do tubo digestório, situada entre o esôfago e o intestino delgado e é responsável pela execução de inúmeras funções, dentre atividades exócrinas, endócrinas e motilidade. Nos ratos esse órgão se estrutura em três regiões histologicamente distintas: córnea, corpo e antro (Johnson, 1985; Lee et al., 1982).

A região córnea, contígua ao esôfago, apresenta epitélio estratificado queratinizado. Já as regiões do corpo e do antro gástrico caracterizam-se por epitélio simples secretor, com a presença de glândulas tubulares que se abrem em fossetas para a luz gástrica (Lee et al., 1982). As glândulas do corpo, localizado na porção mediana do estômago, são longas e podem ser subdivididas em três segmentos distintos no rato adulto: istmo, colo e base (Helander, 1981).

As glândulas gástricas são revestidas por diferentes tipos de células epiteliais que se originam a partir de células-tronco localizadas na região do istmo. Cada linhagem gerada tem

características migratórias, secretórias e tempo de *turnover* próprios (Brittan e Wright, 2004; Karam, 1998; Karam e Leblond, 1993a). Assim, as células precursoras das linhagens celulares gástricas maduras são: célula pré-mucosa superficial, célula pré-parietal, célula pré-mucosa do colo e célula pré-enteroendócrina (Karam, 1993; Karam e Leblond, 1993b, c, d).

A célula pré-mucosa superficial migra do istmo em sentido ascendente para a região da fosseta e se diferencia em célula mucosa superficial, que reveste a superfície luminal do estômago e as fossetas gástricas. Essa linhagem é responsável pela secreção de muco e seu período de *turnover* é de 3 dias (Karam e Leblond, 1993b). Já a célula pré-parietal completa seu processo de diferenciação em célula parietal na região do istmo e então migra em sentido bidirecional, embora seja predominantemente identificada nas regiões de istmo e colo, secretando íons que formarão o ácido clorídrico na luz do estômago. O tempo estimado para seu *turnover* é de 54 dias (Ekelund et al., 1985; Helander, 1981; Karam, 1993, 1998).

A célula pré-mucosa do colo migra do istmo em sentido descendente para a região do colo, na qual se diferencia em célula mucosa do colo, também secretora de muco. De acordo com os estudos de Karam e Leblond (1993c), este tipo celular permanece como "mucosa do colo" por um período aproximado de 7 a 14 dias, após o qual continua migrando em direção à base glandular, onde se diferencia novamente em célula zimogênica, passando por um estágio intermediário de célula pré-zimogênica. Keeley e Samuelson (2010) detectaram a coexpressão de marcadores específicos para células mucosa do colo e zimogênica em um mesmo tipo celular na mucosa de animais recém-nascidos. Estes marcadores só foram encontrados individualmente uma semana após o nascimento, sugerindo que a transição entre célula mucosa do colo e célula zimogênica passa por um estágio em que apresenta características de ambos os tipos celulares.

As células zimogênicas encontram-se na porção basal da glândula gástrica e são responsáveis pela hidrólise proteica ocorrida no estômago, já que secretam o pepsinogênio, que é convertido à pepsina em contato com o meio ácido gerado pela atividade das células parietais. Essa linhagem tem um período de *turnover* de 194 dias, o mais longo dentre as células epiteliais gástricas (Ekelund et al., 1985; Helander, 1981; Johnson, 1985; Karam e Leblond, 1993c).

A célula pré-enteroendócrina acompanha o mesmo perfil descrito para a célula parietal, ou seja, se diferencia em célula enteroendócrina na região do istmo glandular e migra bidirecionalmente, embora seja encontrada em maior quantidade na porção basal da glândula gástrica (Helander, 1981; Karam, 1998, 1999; Karam e Leblond, 1993d;). As células enteroendócrinas representam linhagens distintas que são responsáveis pela síntese de

diversos hormônios, entre os quais: histamina, secretada pelas células ECL (*enterochromaffin-like*), gastrina pelas células G presentes na região do antro gástrico, somatostatina pelas células D (Helander, 1981) e ghrelina pelas células "X/A-like" (Date et al., 2000a; Kojima et al., 1999). O *turnover* para as células enteroendócrinas é estimado em torno de 60 dias na região do corpo gástrico (Karam e Leblond, 1993d).

O antro, localizado na porção distal do estômago, apresenta glândulas curtas e enoveladas, compostas predominantemente por células mucosas e enteroendócrinas. As células parietais e zimogênicas são escassas ou mesmo ausentes nessa região do estômago, o que torna a porção do corpo gástrico a maior responsável pela secreção de ácido clorídrico e pepsinogênio (Helander, 1981).

A morfogênese das glândulas gástricas ocorre tardiamente nos fetos de rato e acarreta modificações morfológicas e fisiológicas importantes (Alvares, 1994). Durante esse processo diversos fatores interagem e favorecem a maturação do epitélio do estômago, influenciando a proliferação, a migração, a diferenciação e a morte celular. Dentre eles estão o programa genético, hormônios, fatores de crescimento, a microbiota, a dieta e o estado nutricional tanto do animal, quanto da própria mãe durante as fases de gestação e lactação (De Andrade Sá et al., 2008; Lee e Lebenthal, 1983; Nanthakumar et al., 2005; Young et al., 1987).

Embora a diferenciação entre as linhagens celulares da mucosa do estômago se inicie entre o meio e o final da gestação nos ratos, as glândulas gástricas se encontram completamente funcionais somente em torno da terceira semana de vida pós-natal, período que coincide com o desmame nesses animais (Keeley e Samuelson, 2010).

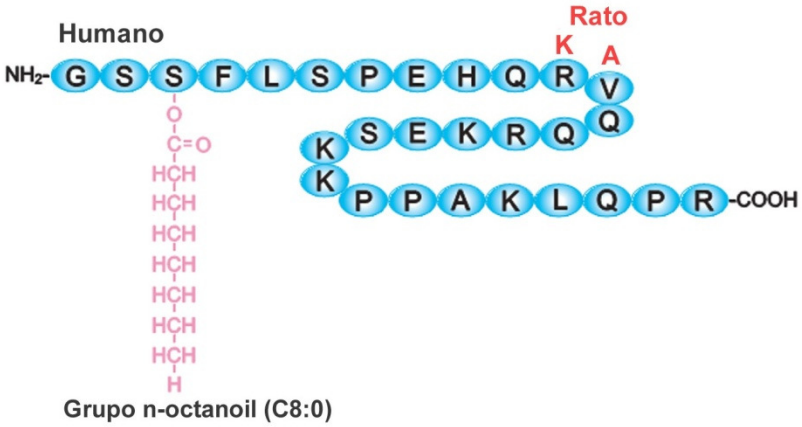
1.3 Ghrelina

A ghrelina é um hormônio peptídico de 28 aminoácidos sintetizado principalmente no estômago (Kojima et al., 1999). A origem de seu nome deriva do termo proveniente do prefixo *ghre*, que significa "crescimento" nas linguagens "Proto-Indo-Europeias", em referência ao estímulo à liberação de hormônio de crescimento (GH) que acarreta (Kojima e Kangawa, 2005). É sintetizada principalmente no estômago, embora outros órgãos também contribuam para sua síntese, mesmo em menores quantidades: intestino delgado, cólon, hipotálamo, hipocampo, hipófise, pâncreas, rins, entre outros, tanto em humanos, quanto em ratos (Date et al., 2000a, 2002; Hosoda et al., 2000a; Sato et al., 2005, 2012; Ueberberg et al., 2009).

A célula enteroendócrina “X/A-like” é a responsável pela síntese de ghrelina no estômago do rato e representa aproximadamente 20% da população de células enteroendócrinas da glândula gástrica da região do corpo do estômago de um rato adulto. Este tipo celular está distribuído principalmente entre o colo e a base da glândula e caracteriza-se por ser uma célula do tipo fechado em sua maioria, ou seja, sem comunicação direta com o lúmen gástrico, porém intimamente associada à rede de capilares da lâmina própria. Células que sintetizam ghrelina e mantêm contato direto com o lúmen, as do tipo aberto, são encontradas em número muito baixo no estômago, mas representam mais de 60% nas regiões do trato gastrointestinal do íleo, ceco e cólon (Date et al., 2000a; Sakata et al., 2002).

A ghrelina se origina de um peptídeo de 117 aminoácidos, a pré-pró-ghrelina, e exibe uma particularidade em seu terceiro aminoácido, uma serina, que é a presença de um grupo acil modificando sua estrutura. Essa acilação é considerada uma característica ímpar da ghrelina e é fundamental para o reconhecimento do hormônio pelo receptor secretagogo de hormônio de crescimento, GHS-R (*growth hormone secretagogue receptor*) e, consequentemente, para que possa exercer suas funções (Kojima et al., 1999). Como mostrado na Figura 1, a ghrelina é bem conservada entre humanos e ratos, com alteração de apenas 2 aminoácidos entre as formas de cada uma das espécies, o que sugere um papel fisiológico importante (Kojima et al., 1999; Wren et al., 2000).

Figura 1 – Sequência de aminoácidos que compõem a ghrelina em humanos e ratos.



FONTE: Adaptado de Kojima e Kangawa (2005).

Hosoda et al. (2000b) identificaram no estômago de ratos uma segunda molécula de ghrelina gerada por *splicing* alternativo, que tem 27 aminoácidos e só difere da original pela ausência da glutamina que ocupa a posição 14 na sequência formadora do peptídeo. Portanto,

a “des-Gln14-ghrelina” também apresenta acilação e é idêntica à ghrelina em termos funcionais, mas é encontrada em proporção muito menor quando comparada à forma de 28 aminoácidos (Kojima e Kangawa, 2005). Além da “des-Gln14-ghrelina”, a forma não acilada da ghrelina (“des-acil-ghrelina”), também foi identificada no estômago e no plasma sanguíneo, sendo que a “des-acil-ghrelina” é a forma predominante em ambos, correspondendo à proporção de 2:1 no estômago. Entretanto, a “des-acil-ghrelina” não é funcional no que diz respeito às atividades endócrinas próprias da ghrelina, mas há investigações no sentido de esclarecer se há um receptor específico para essa forma, e se ela exerceria funções distintas daquelas da ghrelina acilada (Hosoda et al., 2000a; Kojima e Kangawa, 2005).

A enzima responsável pela adição de uma cadeia de ácido-graxo à ghrelina pertence à família das MBOATs (*membrane bound O-acyltransferase*), e é denominada GOAT (*ghrelin O-acyltransferase*). Apresenta-se bem conservada nos vertebrados, com aproximadamente 90% de homologia na sequência de aminoácidos entre humanos, ratos e camundongos. Sua especificidade é tal, que a forma acilada da ghrelina não é encontrada no plasma sanguíneo de camundongos *knock-out* para a GOAT (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008).

A acilação ocorre exclusivamente na serina que ocupa a terceira posição na cadeia de aminoácidos da ghrelina (serina-3) e a GOAT apresenta seletividade entre os tipos de ácidos graxos que serão utilizados na acilação, sendo que os ácidos octanoico e decanoico são as duas formas mais utilizadas, havendo ainda preferência para o primeiro, embora outros tipos de ácidos graxos também possam ser utilizados (Gutierrez et al., 2008; Kojima et al., 1999; Yang et al., 2008). Gutierrez et al. (2008) sugeriram a possibilidade de haver algum tipo específico de metabolismo de ácidos graxos nas células “X/A-like” que priorize a disponibilização dos ácidos octanoico e decanoico para a GOAT catalisar a acilação da ghrelina. Acredita-se que essa modificação pós-traducional seja essencial para permitir que a ghrelina passe pela barreira hemato-encefálica, conferindo o acesso a regiões específicas do cérebro nas quais o receptor GHS-R está presente (Banks et al., 2002).

Sabe-se que os ácidos graxos e triglicérides (ambos de cadeia média) ingeridos com a dieta interferem no tipo de ácido graxo que será utilizado para a acilação da ghrelina, ou seja, o número de carbonos dos ácidos graxos ligados à ghrelina recém acilada corresponde àquele ingerido com a dieta (Nishi et al., 2005a; Sato et al., 2012). Portanto, deve-se ressaltar que a síntese de ghrelina e sua secreção na forma acilada constituem dois processos diferentes, visto que o sistema “GOAT-ghrelina” é dependente de determinados tipos de ácidos graxos, os quais não interferem com o controle da síntese de ghrelina em si (Romero et al., 2010).

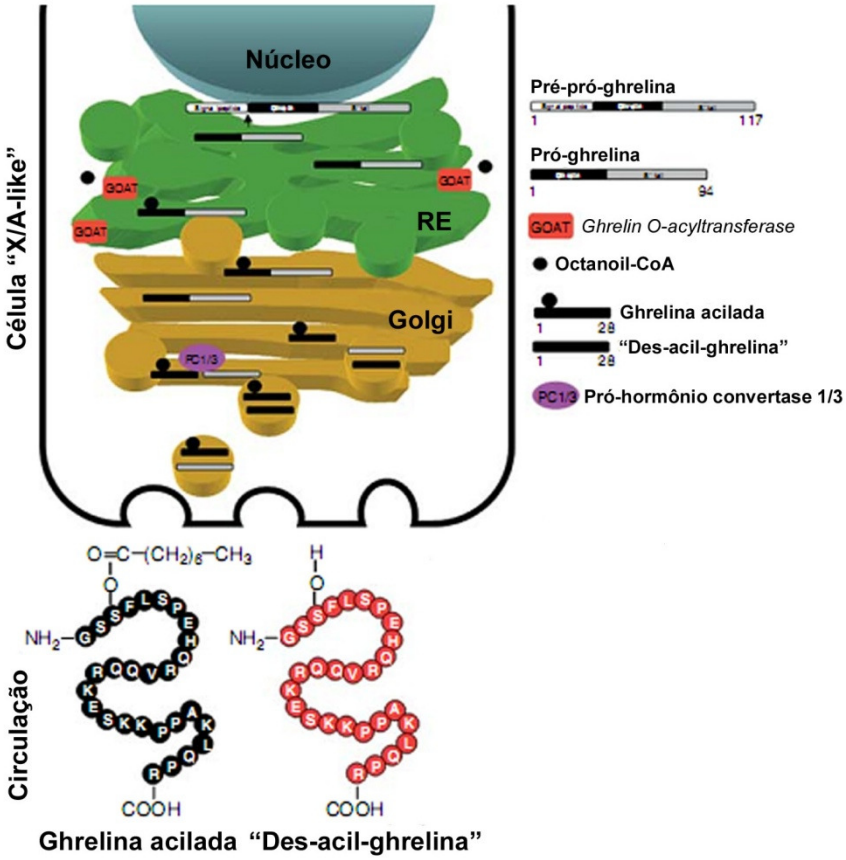
Em concordância com os estudos de Kojima et al. (1999) que indicaram que a síntese de ghrelina ocorre principalmente no estômago, este também é o órgão que mais expressa GOAT (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008). Além disso, outros trabalhos demonstraram alto grau de colocalização (em torno de 95%) de ghrelina e GOAT em células "X/A-like" na mucosa gástrica de camundongos (Sakata et al., 2009; Stengel et al., 2010). Já para os ratos, o grau de colocalização é menor, em torno de 56%, enquanto os outros 44% de células que expressam GOAT foram identificadas como células enteroendócrinas ECL. Assim, a ghrelina parece ser acilada não somente pelas células "X/A-like" nos ratos, mas também pelas células ECL gástricas que expressam GOAT (Stengel et al., 2010).

Da síntese do pré-pró-peptídeo à ghrelina acilada, acredita-se que ocorram as seguintes etapas: a pré-pró-ghrelina sofre a clivagem do peptídeo sinal, que resulta em uma sequência de 94 aminoácidos denominada pró-ghrelina. Em seguida ocorre a modificação pós-traducional mediada pela ação da enzima GOAT. Posteriormente, a pró-hormônio convertase 1/3 (PC 1/3) atua sobre a pró-ghrelina acilada, gerando 2 subprodutos: a ghrelina acilada, correspondente ao fragmento N-terminal do precursor, e a obestatina, correspondente ao fragmento C-terminal do precursor (Gutierrez et al., 2008; Romero et al., 2010; Yang et al., 2008; Zhu et al., 2006). A Figura 2 esquematiza esse processo.

A obestatina é um peptídeo de 23 aminoácidos ao qual foram atribuídas funções contrárias as da ghrelina. Dessa forma, a obestatina seria responsável por inibir a ingestão de alimentos, suprimir o esvaziamento gástrico e a motilidade intestinal e estaria associada à redução de massa corpórea. Entretanto, essas atribuições não foram confirmadas por estudos subsequentes, o que acarretou no questionamento do real papel da obestatina que, até o momento, ainda não foi completamente elucidado (Sato et al., 2012; Zhang et al., 2005).

A ghrelina apresenta diversas funções fisiológicas, dentre elas estão o estímulo da liberação de GH (Date et al., 2000b; Kojima et al., 1999), da secreção de ácido gástrico (Date et al., 2001; Masuda et al., 2000) e da motilidade do estômago (Masuda et al., 2000); o estímulo à formação óssea, com aumento de proliferação e diferenciação de osteoblastos (Fukushima et al., 2005); o aumento do apetite, da ingestão alimentar (Nakazato et al., 2001; Shintani et al., 2001; Tschöp et al., 2000) e o favorecimento do ganho de peso em ratos, caracterizando-a como um hormônio orexigênico (Cummings et al., 2001; Nakazato et al., 2001; Tschöp et al., 2000), diretamente relacionado ao comportamento alimentar e à homeostase energética (Nakazato et al., 2001; Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2000).

Figura 2 – Modificação pós-traducional da pró-ghrelina.



FONTE: Adaptado de Romero et al. (2010).

Alguns estudos vêm relacionando a ghrelina com a proliferação celular maligna, característica do câncer, possivelmente através de um mecanismo autócrino / parácrino, ainda não completamente descrito (De Vriese e Delporte, 2007; Jeffery et al., 2003; Nikolopoulos et al., 2010; Waseem et al., 2008). Sabe-se também que a ghrelina inibe o processo apoptótico em algumas linhagens celulares, como cardiomiócitos (Baldanzi et al., 2002), células intestinais (Park et al., 2008) e células neuronais em processo de isquemia (Chung et al., 2007).

Sánchez et al. (2004), em seu estudo sobre o ritmo dos hormônios ghrelina e leptina, concluíram que ambos estão nitidamente relacionados à ingestão alimentar. Ratos com 3 meses de idade submetidos a um ciclo de 12/12 horas de claro/escuro, apresentaram altos níveis gástricos de ghrelina na fase de claro, coincidente com seu período de jejum, visto que a alimentação dos roedores concentra-se no período noturno (77%). Esses níveis permaneceram altos até o início da fase de escuro, quando houve uma queda abrupta, no momento da alimentação. Dessa forma, os autores demonstraram uma correlação inversa

entre os níveis de ghrelina e a ingestão de alimento, que também é válida em relação ao conteúdo gástrico e aos níveis plasmáticos de leptina.

Assim como o desmame precoce, o desmame tardio também representa uma perturbação do padrão alimentar, pois retarda a introdução de alimento sólido à dieta, já que se baseia no prolongamento do período de lactação exclusiva. Fåk et al. (2007) demonstraram que o desmame tardio reduziu as concentrações de ghrelina no estômago e no plasma sanguíneo e sugeriram que o desmame pode ser um fator importante na regulação da expressão gástrica desse peptídeo.

1.4 Receptor GHS-R

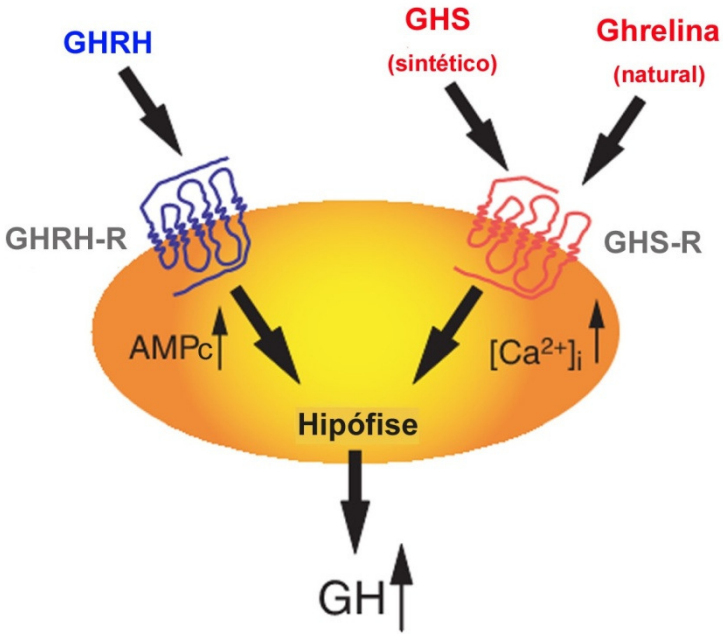
Até recentemente o GHS-R, receptor secretagogo de hormônio de crescimento, era utilizado como alvo de ligantes sintéticos que estimulam a liberação do GH, os secretagogos de GH (GHS). Diferentemente do estímulo gerado pela associação do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH) ao seu receptor GHRH-R, que utiliza como segundo mensageiro o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) intracelular para sinalizar o aumento da liberação de GH, os ligantes sintéticos agem por meio do GHS-R e aumentam a concentração intracelular de cálcio via inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3), que causa a subsequente elevação do GH. Ambos, GHS e GHRH, agem de maneira independente e sinérgica no estímulo à liberação do GH (Akman et al., 1993; Blake e Smith, 1991; Cheng et al., 1989, 1991).

Howard et al. (1996) revelaram que o GHS-R é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) e sugeriram que os ligantes sintéticos GHS mimetizam a ação de uma molécula endógena ainda não identificada. Então, Kojima et al. (1999) realizaram um experimento de farmacologia reversa na tentativa de encontrar este ligante do GHS-R, até então considerado um receptor órfão. Assim, uma linhagem celular expressando GHS-R de rato foi exposta a extratos de cérebro, pulmão, coração, rim, estômago e intestino, e por monitoramento das concentrações intracelulares de cálcio, foi detectada maior atividade em resposta ao extrato de estômago, órgão do qual a ghrelina pode ser purificada e identificada. A Figura 3 mostra a regulação da liberação do GH hipofisário pelos dois receptores: GHRH-R e GHS-R.

Como um típico receptor do tipo GPCR, o GHS-R exibe sete domínios transmembrana e apresenta-se sob duas formas, denominadas 1a e 1b, sendo a segunda gerada por *splicing* alternativo. O gene do *GHS-R* é formado por 2 éxons e 1 íntron, sendo que o primeiro éxon codifica os domínios transmembrana de 1 a 5, enquanto o segundo codifica os domínios 6 e 7.

Assim, o GHS-R1a deriva de ambos os éxons, resulta em um GPCR clássico com 7 domínios transmembrana, e responde pelas atividades da ghrelina. Já o GHS-R1b deriva do primeiro éxon apenas, resultando em um receptor truncado, com 5 domínios transmembrana somente e funcionalmente inativo (Howard et al., 1996; Kojima e Kangawa, 2005; McKee et al., 1997).

Figura 3 – Liberação de GH pela hipófise por meio dos receptores GHRH-R e GHS-R.



FONTE: Adaptado de Kojima e Kangawa (2005).

O GHS-R1a está distribuído em duas áreas no cérebro: hipófise e hipotálamo (Howard et al., 1996). Sua expressão na hipófise é consistente com o aumento da liberação de GH provocado pela ghrelina, enquanto sua expressão no hipotálamo, principalmente na região do núcleo arqueado, é crucial para as atividades orexigênicas da ghrelina (Camiña, 2006; Tannenbaum et al., 1998). Além dessas áreas, o GHS-R1a também é encontrado em diversos tecidos, como: estômago, intestino, pâncreas, baço, tireoide, coração, pulmão, glândula adrenal, testículo e ovário (Dass et al., 2003; Gnanapavan et al., 2002; Kojima e Kangawa, 2005; Shuto et al., 2001; Ueberberg et al., 2009). Esta vasta distribuição periférica do GHS-R1a sugere que a ghrelina possa ter outras funções que não somente o estímulo à liberação de GH e a participação no controle da homeostase energética (Camiña, 2006; Gnanapavan et al., 2002).

A forma truncada do receptor, GHS-R1b, também é amplamente distribuída em diferentes tecidos, muitas vezes até em níveis maiores que o GHS-R1a (Gnanapavan et al.,

2002). Entretanto, até o presente momento, o significado funcional da presença desta isoforma é desconhecido, mas não se descarta a possibilidade de haver um ligante endógeno ainda não identificado para o GHS-R1b (Camiña, 2006; Gnanapavan et al., 2002).

Como mencionado anteriormente, há estudos mostrando que tanto a ghrelina quanto o receptor GHS-R estão presentes em diferentes tipos de tumor e sugerem que a ghrelina atua possivelmente através de mecanismos autócrinos / parácrinos na proliferação maligna e carcinogênese (De Vriese e Delporte, 2007; Jeffery et al., 2003; Nikolopoulos et al., 2010; Waseem et al., 2008).

Waseem et al., (2008) demonstraram que a expressão de ghrelina e de GHS-R1b está aumentada no câncer colorretal e seu aumento é gradativo, de acordo com o estágio de malignidade do tumor. Ao contrário, a expressão de GHS-R1a diminui drasticamente. Esse achado sugere que a ghrelina possivelmente age no controle proliferativo maligno e pode favorecer o comportamento invasivo do tumor através do GHS-R1b ou ainda através de outro receptor ainda não identificado. Deve-se ressaltar que, embora os níveis teciduais de ghrelina sejam altos, os níveis plasmáticos medidos em jejum não podem ser correlacionados com o estágio de progressão de tumor, mas sim com a condição metabólica do indivíduo. Isto reforça a ideia de que a ação da ghrelina e seus receptores em tumores está associada a um mecanismo autócrino / parácrino, e não à regulação endócrina pela qual este hormônio exerce suas atividades clássicas (Waseem et al., 2008).

1.5 [D-Lys-3]-GHRP-6

Os secretagogos de GH, conhecidos como GHS, são componentes sintéticos peptídicos ou não peptídicos capazes de estimular a liberação de GH de maneira dose-dependente. São considerados compostos importantes na prática clínica, visto que alguns GHS podem ser indicados como agentes terapêuticos nos casos de deficiência idiopática de GH em crianças e adultos, como estimuladores de processos anabólicos em idosos e ainda podem ser utilizados como coadjuvantes no tratamento de processos catabólicos debilitantes, como a osteoporose e a AIDS (Inui, 2001).

Um dos GHS mais conhecidos, o hexapeptídeo GHRP-6 foi sintetizado em 1984 e mostrou atividade específica e dose-dependente no estímulo à liberação de GH *in vitro* e *in vivo*, já que outros hormônios hipofisários, como o estimulante da tireoide (TSH), o luteinizante (LH), o folículo-estimulante (FSH) e a prolactina (PRL), não responderam ao uso deste sintético. Além disso, a administração crônica do GHRP-6 em ratas promoveu aumento

significativo de massa corpórea (Bowers et al., 1984; Momany et al., 1984), o que foi confirmado e ampliado pelo estudo de Lall et al. (2001) que revelaram que o GHRP-6 promove aumento da adiposidade, do consumo de alimento e dos níveis séricos de leptina em camundongos, sugerindo uma atividade orexigênica.

Cheng et al. (1989) revelaram que [D-Lys-3]-GHRP-6, um análogo do GHRP-6 obtido através da substituição da alanina pela lisina na posição 3 da sequência de aminoácidos, inibe o estímulo que o GHRP-6 provoca na liberação de GH de maneira dose-dependente e por meio do mesmo receptor por ele utilizado, atualmente identificado como GHS-R.

No experimento que resultou na identificação da ghrelina realizado por Kojima et al. (1999), o peptídeo [D-Lys-3]-GHRP-6 foi utilizado como antagonista do GHS-R e ficou demonstrado que o aumento da concentração de cálcio intracelular promovido pela ligação da ghrelina ao receptor foi inibido em sua presença. Entretanto, uma dose maior de ghrelina foi capaz de reestabelecer os níveis de cálcio intracelular observados na ausência do antagonista, sugerindo assim que [D-Lys-3]-GHRP-6 atua como um antagonista competitivo.

No estudo de Asakawa et al. (2003) o uso de [D-Lys-3]-GHRP-6 diminuiu significativamente a ingestão de alimento de maneira dose-dependente tanto em camundongos alimentados com uma dieta padrão (12% de gordura), quanto em camundongos alimentados com uma dieta rica em gorduras (45% de gordura). Camundongos obesos (*ob/ob*) também apresentaram queda no consumo alimentar, além de redução no ganho de peso após um tratamento com o peptídeo em questão a cada 12 h por 6 dias consecutivos. Outros estudos reforçam esta ingestão alimentar reduzida associada ao uso de [D-Lys-3]-GHRP-6, como os trabalhos de Beck et al. (2004) e Xin et al. (2006). O comprometimento das taxas de esvaziamento gástrico também é relatado com o uso desta molécula (Asakawa et al., 2003; Kitazawa et al., 2005).

Desde a associação de [D-Lys-3]-GHRP-6 com a ghrelina no sentido de contrapor as suas atividades, atuando de forma anorexigênica, esta molécula foi adotada e é utilizada como antagonista do receptor GHS-R, apesar da escassez de informações farmacológicas relativas a este peptídeo na literatura.

7 CONCLUSÕES

Diante dos nossos resultados, podemos constatar que:

1) A condição de desmame precoce altera o número de células secretoras de ghrelina na mucosa gástrica, porém não interfere na sua distribuição na glândula e esta variação foi concomitante, ou até mesmo precedida, pelo aumento de massa corpórea;
2) O receptor GHS-R está presente epitélio do estômago pelo menos desde o 15º dia de vida pós-natal;
3) O GHS-R gástrico não sofre modificações advindas do desmame precoce;
4) A inibição da ghrelina resulta em diminuição do índice de síntese de DNA na mucosa gástrica dos filhotes submetidos ao desmame precoce.

Com base nestes resultados, podemos sugerir que os níveis de ghrelina na mucosa gástrica são afetados por mudanças no padrão de dieta e que a ghrelina parece participar do controle proliferativo do epitélio do estômago, devendo ser considerada um importante elemento no complexo mecanismo regulatório do crescimento gástrico durante a transição alimentar representada pelo desmame.

REFERÊNCIAS[1]

Ackerman SH, Hofer MA, Weiner H. Predisposition to gastric erosions in the rat: behavioral and nutritional effects of early maternal separation. Gastroenterology. 1978;75(4):649-54.

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

Akman MS, Girard M, O´Brien LF, Ho AK, Chik CL. Mechanisms of action of a second generation growth hormone-releasing peptide (Ala-His-D-betaNal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH_2) in rat anterior pituitary cells. Endocrinology. 1993;132(3)1286-91.

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(6):641-9.

Alvares EP. Extensive networks of TMPase positive basal lysosomes are present in fetal rat gastric epithelium before overt differentiation. J Submicrosc Cytol Pathol. 1994;26(4):515-23.

Alvares EP, Gama P. Fasting enhances cell proliferation of gastric epithelium during the suckling period in rats. Braz J Med Biol Res. 1993;26(8):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(2):147-53.

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. Gut. 2003;52(7):947-52.

Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonissoni 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.

Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. J Pharmacol Exp Ther. 2002;302(2):822-7.

Blake AD, Smith RG. Desensitization studies using perifused rat pituitary cells show that growth hormone-releasing hormone and His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH_2 stimulate growth hormone release through distinct receptor sites. J Endocrinol. 1991;129(1):11-9.

Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A. Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. Life Sci. 2004;76(4):473-8.

[1] De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html> [2007 May 22].

Björkqvist M, Dornonville de la Cour C, Zhao CM, Gagnemo-Persson R, Håkanson R, Norlén P. Role of gastrin in the development of gastric mucosa, ECL cells and A-like cells in newborn and young rats. Regul Pept. 2002;108(2-3):73-82.

Boyle JT, Koldovský O. Critical role of adrenal glands in precocious increase in jejunal sucrose activity following premature weaning in rats: negligible effect of food intake. J Nutr. 1980;110(1):169-77.

Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the *in vitro* and *in vivo* activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. Endocrinology. 1984;114(5):1537-45.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. II Pesquisa de prevalência de aleitamento materno nas capitais brasileiras e Distrito Federal. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_prevalencia_aleitamento_materno.pdf>. [2012 abr. 19].

Brittan M, Wright NA. The gastrointestinal stem cell. Cell Prolif. 2004;37(1):35-53.

Camiña JP. Cell biology of the ghrelin receptor. J Neuroendocrinol. 2006;18(1):65-76.

Chanoine JP, Wong AC. Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting. Endocrinology. 2004;145(8):3813-20.

Chanoine JP, Wong AC, Barrios V. Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. Horm Res. 2006;66(2):81-8.

Chanoine JP, De Waele K, Walia P. Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor in growth and development. Int J Obes (Lond). 2009;33 Suppl 1:S48-52.

Cheng K, Chan WW, Barreto A Jr, Convey EM, Smith RG. The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH_2 on growth hormone (GH)-releasing factor - stimulated GH release and intracellular adenosine 3´,5´-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture. Endocrinology. 1989;124(6):2791-8.

Cheng K, Chan WW, Butler B, Barreto A Jr, Smith RG. Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH_2-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. Endocrinology. 1991;129(6):3337-42.

Chung H, Kim E, Lee DH, Seo S, Ju S, Lee D, Kim H, Park S. Ghrelin inhibits apoptosis in hypothalamic neuronal cells during oxygen-glucose deprivation. Endocrinology. 2007;148(1):148-59.

Cripps RL, Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Fetal and perinatal programming of appetite. Clin Sci (Lond). 2005;109(1):1-11.

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(8):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. 2000a;141(11):4255-61.

Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. Biochem Biophys Res Commun. 2000b;275(2):477-80.

Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. Biochem Biophys Res Commun. 2001;280(3):904-7.

Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. Diabetes. 2002;51(1):124-9.

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(1-3):293-302.

De Vriese C, Delporte C. Autocrine proliferative effect of ghrelin on leukemic HL-60 and THP-1 cells. J Endocrinol. 2007;192(1):199-205.

Donovan SM, Odle J. Growth factors in milk as mediators of infant development. Annu Rev Nutr. 1994;14:147-67.

Ekelund M, Hakanson R, Hedenbro J, Rehfeld JF, Sundler F. Endocrine cells and parietal cells in the stomach of the developing rat. Acta Physiol Scand. 1985;124(4):483-97.

Fåk F, Friis-Hansen L, Weström B, Wierup N. Gastric ghrelin cell development is hampered and plasma ghrelin is reduced by delayed weaning in rats. J Endocrinol. 2007;192(2):345-52.

Figueiredo PM. Papel da interação entre padrão alimentar, corticosterona e fatores de crescimento na regulação da proliferação celular no epitélio gástrico de ratos em desenvolvimento pós-natal. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

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.

Gama P, Alvares EP. LHRH and somatostatin effects on the cell proliferation of the gastric epithelium in suckling and weaning rats. Regul Pept. 1996;63(2-3):73-8.

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(10):2594-8.

Glavin GB, Pare WP. Early weaning predisposes rats to exacerbated activity-stress ulcer formation. Physiol Behav. 1985;34(6):907-9.

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(6):2988-91.

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.

Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. Brain Res Mol Brain Res. 1997;48(1):23-9.

Harder T, Bergmann R, Kallischnigg G, Plagemann A. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. Am J Epidemiol. 2005;162(5):397-403.

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(2):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(3):G199-214.

Horta BL, Bahl R, Martines JC, Victora CG. Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic review and meta-analyses. Geneva: WHO Press; 2007. Available from: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241595230_eng.pdf>. [2012 Apr 19].

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. 2000a;279(3):909-13.

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. J Biol Chem. 2000b;275(29):21995-2000.

Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer

JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. Science. 1996;273(5277):974-7.

Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. Nat Rev Neurosci. 2001;2(8):551-60.

Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK. The potential autocrine/paracrine roles of ghrelin and its receptor in hormone-dependent cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2003;14(2):113-22.

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

Karam SM. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss. Anat Rec. 1993;236(2):314-32.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. Anat Rec. 1993a;236(2):259-79.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. II. Outward migration of pit cells. Anat Rec. 1993b;236(2):280-96.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. Anat Rec. 1993c;236(2):297-313.

Karam SF, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells: general conclusions on cell kinetics in the oxyntic epithelium. Anat Rec. 1993d;236(2):333-40.

Karam SM. Cell lineage relationship in the stomach of normal and genetically manipulated mice. Braz J Med Biol Res. 1998;31(2):271-9.

Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. Front Biosci. 1999;4:D286-98.

Kasai A, Gama P, Alvares EP. Protein restriction inhibits gastric cell proliferation during rat postnatal growth in parallel to ghrelin changes. Nutrition. 2011 Dec 30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2011.10.003>. [2012 Apr 19].

Keeley TM, Samuelson LC. Cytodifferentiation of the postnatal mouse stomach in normal and Huntingtin-interacting protein 1-related-deficient mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;299(6):G1241-51.

Kikusui T, Mori Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. J Neuroendocrinol. 2009;21(4):427-31.

Kitazawa T, De Smet B, Verbeke K, Depoortere I, Peeters TL. Gastric motor effects of peptide and non-peptide ghrelin agonist in mice *in vivo* and *in vitro*. Gut. 2005;54(8):1078-84.

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(6762):656-60.

Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. Physiol Rev. 2005;85(2):495-522.

Koldovský O. Response of the gastrointestinal tract to premature weaning in experimental animals. Pediatrics 1985;75(1 Pt 2):199-206.

Koldovský O. Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. J Nutr. 1989;119(11):1543-51.

Koldovský O, Illnerová H, Macho L, Strbák V, Stěpánková R. Milk-borne hormones: possible tools of communication between mother and suckling. Physiol Res. 1995;44(6):349-51.

Lall S, Tung LY, Ohlsson C, Jansson JO, Dickson SL. Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. Biochem Biophys Res Commun. 2001;280(1):132-8.

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(3):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(1):185-90.

Lee PC, Lebenthal E. Early weanling and precocious development of small intestine in rats: genetic, dietary or hormonal control. Pediatr Res. 1983;17(8):645-50.

Lima N da S, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. Br J Nutr. 2011;105(9):1405-13.

Lin CH, Correia L, Tolia K, Gesell MS, Tolia V, Lee PC, Luk GD. Early weaning induces jejunal ornithine decarboxylase and cell proliferation in neonatal rats. J Nutr. 1998;128(10):1636-42.

Lin CH, Lyons H, Seelbach MS, Tolia V, Vijesurier R. Induction of gastric ornithine decarboxylase in early weaning rats. Digestion. 2001;63(4):214-9.

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.

McGirr R, McFarland MS, McTavish J, Luyt LG, Dhanvantari S. Design and characterization of a fluorescent ghrelin analog for imaging the growth hormone secretagogue receptor 1a. Regul Pept. 2011;172(1-3)69-76.

McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. Mol Endocrinol. 1997;11(4):415:23.

Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Hong A, Newlander K. Conformational energy studies and *in vitro* and *in vivo* activity data on growth hormone-releasing peptides. Endocrinology. 1984;114(5):1531-6.

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(6817):194-8.

Nanthakumar NN, Young C, Ko JS, Meng D, Chen J, Buie T, Walker WA. Glucocorticoid responsiveness in developing human intestine: possible role in prevention of necrotizing enterocolitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;288(1):G85-92.

Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G. Ghrelin: a potential therapeutic target for cancer. Regul Pept. 2010;163(1-3):7-17.

Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. Endocrinology. 2005a;146(5):2255-64.

Nishi Y, Hiejima H, Mifune H, Sato T, Kangawa K, Kojima M. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. Endocrinology. 2005b;146(6):2709-15.

Ogias D, de Andrade Sá ER, Alvares EP, Gama P. Opposite effects of fasting on TGF-beta3 and TbetaRI distribution in the gastric mucosa of suckling and early weanling rats. Nutrition. 2010;26(2):224-9.

Osaki LH, Curi MA, Alvares EP, Gama P. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: possible role of TGFalpha/EGFR. Differentiation. 2010;79(1):48-56.

Osaki LH, Figueiredo PM, Alvares EP, Gama P. EGFR is involved in control of gastric cell proliferation through activation of MAPK and Src signalling pathways in early-weaned rats. Cell Prolif. 2011;44(2):174-82.

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.

Penttila IA, van Spriel AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, Zola H, Read LC. Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. Pediatr Res. 1998;44(4):524-31.

Romero A, Kirchner H, Heppner K, Pfluger PT, Tschöp, MH, Nogueiras R. GOAT: the master switch for the ghrelin system? Eur J Endocrinol. 2010;163(1):1-8.

Rozen S, Skaletsky HJ. Primer 3. 1998. Available from: <http://www.broadinstitute.org/genome_software/other/primer3.html>. [2012 Apr 19].

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

Sakata I, Yang J, Lee CE, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Elmguist JK, Zigman JM. Colocalization of ghrelin *O*-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;297(1):E134-41.

Sánchez J, Oliver P, Picó C, Palou A. Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats. Pflugers Arch. 2004;448(5):500-6.

Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-D-glucose administration. Endocrinology. 2005;146(6):2510-6.

Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. J Biochem. 2012;151(2):119-28.

Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. Diabetes. 2001;50(2):227-32.

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.

Smith SS, Ojeda SR. Maternal modulation of infantile ovarian development and available ovarian luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors via milk LHRH. Endocrinology. 1984;115(5):1973-83.

Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW. Differential distribution of ghrelin-*O*-acyltransferase (GOAT) immunoreactive cells in the mouse and rat gastric oxyntic mucosa. Biochem Biophys Res Commun. 2010;392(1):67-71.

Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD. Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. Endocrinology. 1998;139(10):4420-3.

Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature. 2000;407(6806):908-13.

Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. Horm Metab Res. 2009;41(11):814-21.

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.

Waseem T, Javaid-Ur-Rehman, Ahmad F, Azam M, Qureshi MA. Role of ghrelin axis in colorectal cancer: a novel association. Peptides. 2008;29(8):1369-76.

World Health Organization. Global strategy for infant and young child feeding. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Fifty-fourth World Health Assembly – A54/INF.DOC./4. 2001. Available from: <http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA54/ea54id4.pdf>. [2012 Apr 19].

World Health Organization. Infant and young child nutrition. Global strategy on infant and young child feeding. Fifty-fifth World Health Assembly – A55/15. 2002. Available from: <http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA55/ea5515.pdf>. [2012 Apr 19].

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(11):4325-8.

Xin Z, Serby MD, Zhao H, Kosogof C, Szczepankiewicz BG, Liu M, Liu B, Hutchins CW, Sarris KA, Hoff ED, Falls HD, Lin CW, Ogiela CA, Collins CA, Brune ME, Bush EN, Droz BA, Fey TA, Knourek-Segel VE, Shapiro R, Jacobson PB, Beno DWA, Turner TM, Sham HL, Liu G. Discovery and pharmacological evaluation of growth hormone secretagogue receptor antagonists. J Med Chem. 2006;49(15):4459-69.

Xu RJ. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. Reprod Fertil Dev. 1996;8(1):35-48.

Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. Cell. 2008;132(3):387-96.

Young CM, Lee PC, Lebenthal E. Maternal dietary restriction during pregnancy and lactation: effect on digestive organ development in suckling rats. Am J Clin Nutr. 1987;46(1):36-40.

Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin´s effects on food intake. Science. 2005;310(5750):996-9.

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