

Papel de la Ghrelina en la fisiopatología del comportamiento alimentario

LM. Seoane¹, M. Lage², O. Al-Massadi², C. Diéguez³, FF. Casanueva¹

¹Laboratorio de Endocrinología Molecular. Departamento de Medicina. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. ²Laboratorio de Endocrinología Molecular. Departamento de Medicina. ³Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela

Correspondencia:

Prof. Felipe Casanueva

Laboratorio de Endocrinología Molecular. Departamento de Medicina

Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela

(endocrin@usc.es)

Resumen

La ghrelina, es el ligando endógeno para el receptor de secretagogos de GH. Se ha aislado a partir de estómago, aunque existen otros tejidos que también expresan ghrelina, como es el caso de la hipófisis, hipotálamo, placenta, ovario, testículo, etc.

Se ha visto como la ghrelina está implicada en la secreción de GH, tanto in vivo, como in vitro, existen evidencias que demuestran como la administración de ghrelina induce secreción de GH. Existen datos in vivo, donde se demuestra que la potencia secretora de GH de la ghrelina es incluso superior a la que ejerce el GHRH, que hasta hace poco se consideraba el más potente de los secretagogos de GH endógenos.

Existen evidencias de la acción reguladora de la ghrelina sobre la ingesta y la homeostasis energética. Existe un papel claro de la ghrelina en las distintas alteraciones alimentarias como en el caso de la obesidad, anorexia y bulimia.

Palabras clave: Ghrelina. Hormona de crecimiento. Obesidad. Anorexia nerviosa. Bulimia.

Summary

Ghrelin, the endogenous ligand for GHS-R, was isolated from rat stomach, although other tissues exist expressing ghrelin, such as pituitary, hypothalamus, placenta, ovary, testes, etc.

It was showed that ghrelin is implicated in GH secretion, in vivo and in vitro. There are direct evidences that proof that ghrelin administration induces GH secretion. There are in vivo data, showing ghrelin as a most potent GH secretor than GHRH.

Evidences exist of ghrelin actions in the regulation of food intake and energy homeostasis. Ghrelin has a clear role in the different pathologies such as obesity, anorexia and bulimia.

Key words: Ghrelin. Growth hormone. Obesity. Anorexia nervosa. Bulimia.

Ghrelina

A finales de los años 70 se sintetizaron las primeras moléculas con actividad liberadora de GH, una serie de péptidos sintéticos denominados secretagogos de GH (GHRP)¹. Posteriormente se sintetizaron otros compuestos similares de naturaleza tanto peptídica, como no peptídica recibiendo conjuntamente el nombre de secretagogos de GH (GHS)².

GHRH y los GHS actúan través de distintos receptores y por diversas vías. El descubrimiento de los secretagogos de GH sintéticos puso de manifiesto la posible existencia de una tercera vía endocrina que controla la liberación pulsátil de GH, además de las ya conocidas, GHRH y Somatostatina.

El descubrimiento y clonación en 1996 del receptor específico para secretagogos de GH (R-GHS)³ puso de manifiesto la existencia de un ligando endógeno para este receptor. En el año 99 el grupo de Kangawa purificó a partir de estómago de rata el ligando endógeno para los receptores de secretagogos de GH denominado Ghrelina⁴.

Receptor para secretagogos de GH (GHS-R)

Los receptores para secretagogos de GH pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembrana⁵. Se han aislado dos tipos de este receptor, el tipo 1a y el tipo 1b⁶.

El gen de R-GHS se transcribe activamente tanto en la hipófisis anterior como en el cerebro, es especialmente abundante en diversos núcleos hipotalámicos como el arcuato y ventromedial que son los que están implicados en regulación de la secreción de GH⁷.

Originalmente se creía que este receptor se expresaba exclusivamente en distintos núcleos del cerebro y a bajas dosis en páncreas⁸.

Existe expresión de ARNm de GHS-R 1a, además de en hipófisis y a niveles mucho más bajos, en tiroides, miocardio, bazo y glándula adrenal.

Biología molecular de la Ghrelina

La ghrelina es la resultante de la llamada "Farmacología reversa", que empezó con el desarrollo de los secretagogos de GH artificiales, siguió con la clonación del receptor y finalmente la identificación de hormona natural.

A partir del estómago de rata se aisló y purificó un péptido de 28 aminoácidos al que se denominó ghrelina⁹. La ghrelina presenta una esterificación esencial para su actividad biológica, es una n-octanoilación en el residuo 3 de serina¹⁰. La Des-Gln14-ghrelina es idéntica a la ghrelina excepto en una glutamina que se ha perdido en posición 14 y está presente sólo en cantidades muy bajas en el estómago, indicando que la ghrelina es la forma de mayor actividad.

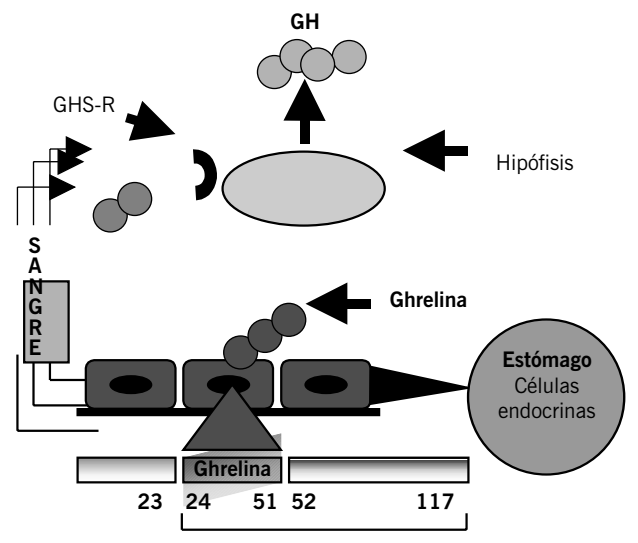
Existen, además, otras isoformas de la Ghrelina, que dependiendo del tipo de acilación que presentan en el residuo 3 de serina se clasifican en cuatro tipos distintos: Ghrelina 27aa octanoilado, Ghrelina decanoilado, Ghrelina 27aa decanoilado y Ghrelina decenoilado¹¹.

Distribución de la Ghrelina en los diferentes tejidos

Existe expresión de ghrelina en el tracto gastrointestinal, específicamente en las células X/A, que contienen gránulos densos y compactos con ghrelina¹². La secreción ocurre directamente al plasma y no en el interior del tracto intestinal, y por tanto la ghrelina es secreta a la sangre portal, para circular así, a través de todo el cuerpo. Se han encontrado también bajas concentraciones de ghrelina en el resto del intestino, incluido el colon.

Hay ghrelina en el núcleo arcuato del hipotálamo⁹. Existen neuronas inmunoreactivas para ghrelina en los núcleos paraventricular, arcuato, ventromedial y dorsomedial del hipotálamo y en la región perifornical y lecho endependial del tercer ventrículo¹³.

Figura 1. Producción de ghrelina en estómago y liberación a la circulación



La ghrelina también ha sido identificada en placenta¹⁴ aunque en este tejido la función fisiológica de esta nueva hormona es todavía desconocida.

Existen otros tejidos que expresan Ghrelina, como es el caso de la hipófisis, donde la ghrelina es expresada concretamente en células somatotropas, lactotropas y tiotropas¹⁵, el corazón, donde se sugiere que podrían existir efectos cardiovasculares de la ghrelina¹⁶. Además de estos tejidos, el hígado, el páncreas endocrino, las gónadas, los pulmones y los linfocitos expresan también pequeñas cantidades de ghrelina.

Acciones fisiológicas de la Ghrelina

Papel de la ghrelina en la regulación de la función somatotropa y secreción de GH

La ghrelina es un potente liberador de GH tanto en rata como en humanos. Se ha postulado que el péptido secretado desde el estómago circula en la sangre para estimular secreción de GH por las células somatotropas⁹ (Figura 1). Esta hormona estimula específicamente liberación de GH a partir de células hipofisarias de rata, permaneciendo inalterados los niveles de otras hormonas hipofisarias (ACTH, FSH, LH, PRL y TSH), por el contrario *in vivo* la ghrelina estimula también secreción de prolactina y ACTH. Se puede afirmar que la ghrelina estimula liberación de GH *in vivo* en ratas en movimiento libre con una potencia mayor que el GHRH¹⁷ (Figura 2).

La ghrelina media la secreción de GH de una manera dosis dependiente¹⁸. Existen trabajos donde se demuestra que GHRH incrementa expresión tanto de ghrelina¹⁹ como del receptor de GHS²⁰ en hipófisis. Poco se sabe de la interacción entre SS y ghrelina. *In vitro* donde se demuestra como la ghrelina es capaz de inhibir liberación de SS estimulada por hiperpolarización mientras que no afecta a la secreción basal de SS²¹. Mediante estudios de hibridación *in situ* se ha determinado que la administración central de Ghrelina en rata, no produce variaciones significativas de los niveles de ARNm de GHRH ni de SS en el hipotálamo, esto parece deberse a un mecanismo de *feed-back* de la propia GH que podría estar enmascarando el efecto de ghrelina sobre la expresión de estos neuropéptidos²². Cuando se realizaron estas medidas sobre ratas Dwarf, deficientes en GH se observó como los niveles de ARNm de SS en se ven incrementados tras la administración de Ghrelina²² (Figura 3).

Acciones de la Ghrelina sobre la regulación de la ingesta

La administración de ghrelina a humanos induce poderosamente la sensación de hambre en el 75% de los individuos estudiados²³. En roedores, la ghrelina estimula la ingesta e induce adiposidad tanto a nivel central como periférico²⁴. La existencia de cambios relevantes en los niveles plasmáticos de ghrelina asociados a la ingesta, parecen reafirmar la hipótesis de que la ghrelina circulante derivada del estómago regula los mecanismos centrales relacionados con el apetito. Se cree que el efecto orexigénico de la ghrelina debe estar parcialmente mediado por la actividad aferente del nervio vago²⁵.

Figura 2. Niveles plasmáticos de GH (Media±SEM), tras la administración de Vehículo, Ghrelina y GHRH en ratas macho adultas en libre movimiento

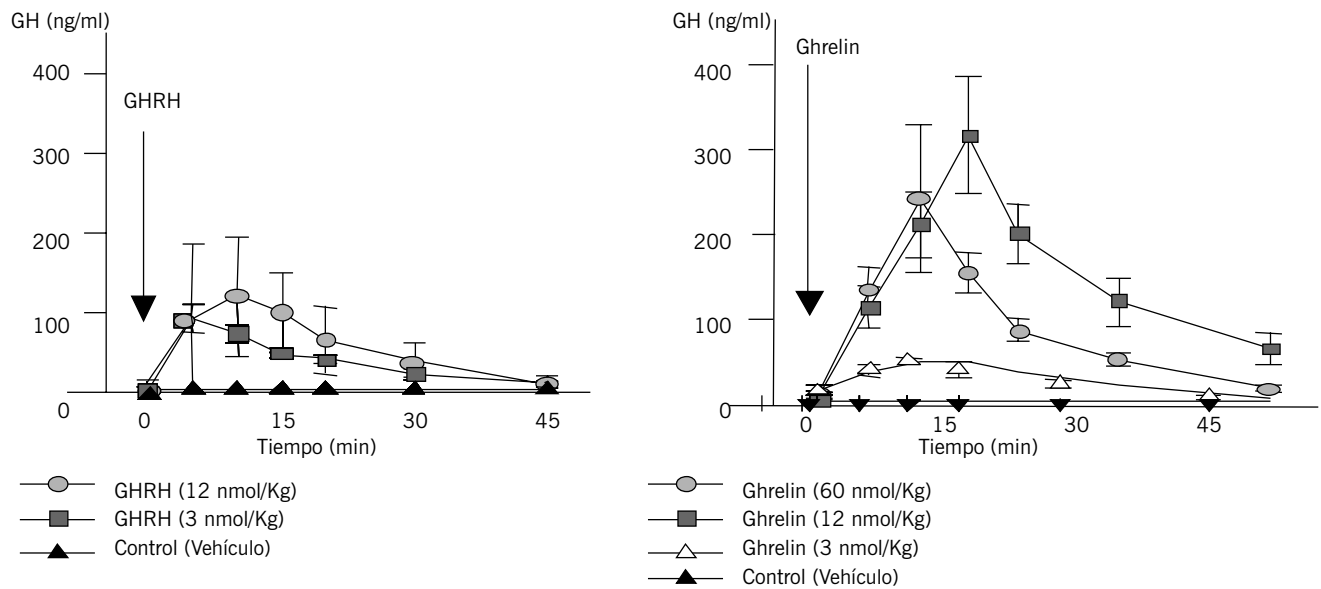
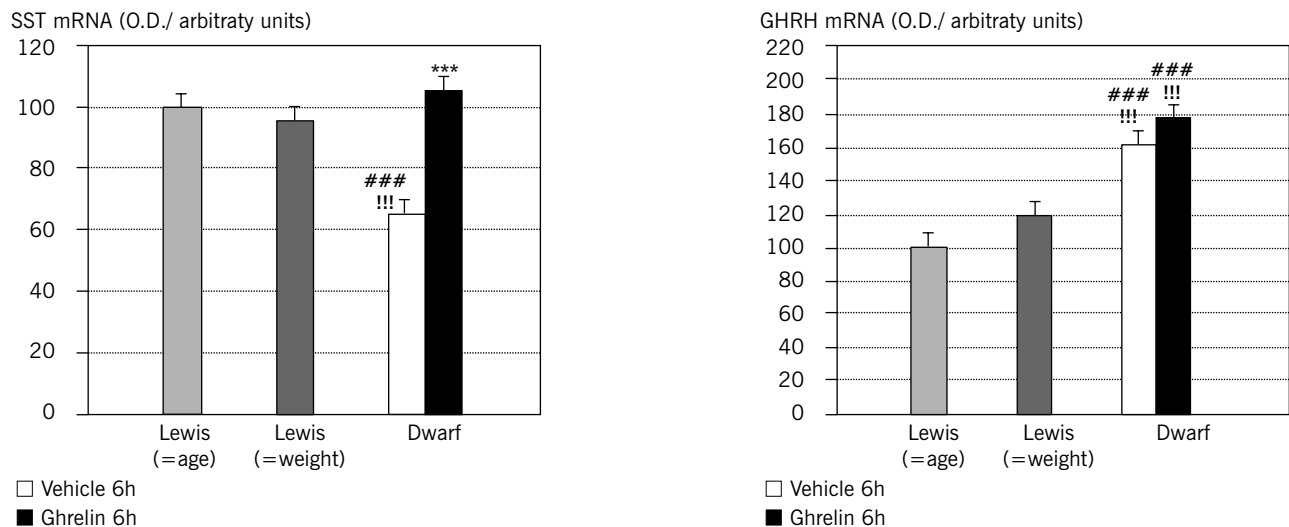


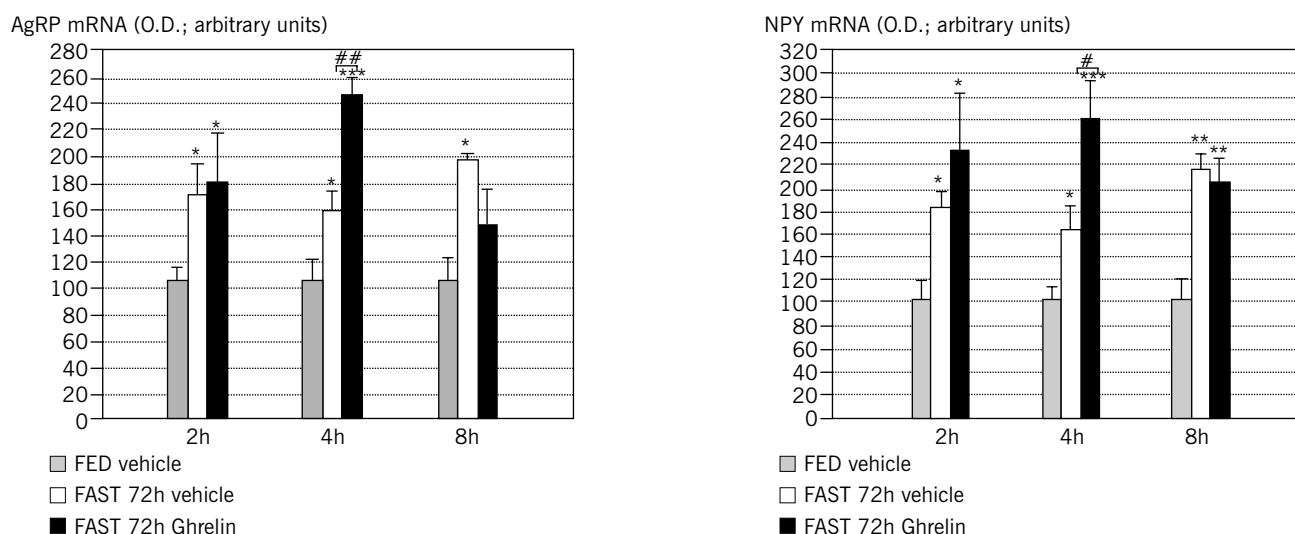
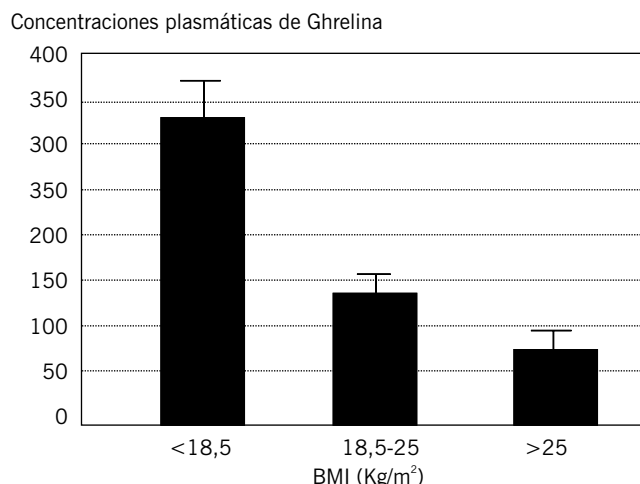
Figura 3. Niveles de ARNm de GHRH núcleo arcuato y de SS en el periventricular de ratas normales y Dwarf obtenidas mediante hibridación *in situ*



Interacción de Ghrelina con las neuronas NPY/AGRP en el núcleo arcuato

Existen evidencias que demuestran como el efecto orexigénico de ghrelina podría estar mediado por su acción en el núcleo arcuato sobre las neuronas de NPY/AgRP^{26,27}. Parece que el receptor Y1 de NPY es una de las vías implicadas en la acción orexigénica de la ghrelina^{25,28}. Las neuronas de AgRP/ NPY son dianas para la acción orexigénica de ghrelina en el

hipotálamo. Este efecto parece ser bastante específico ya que se ha visto que otros neuropéptidos orexigénicos no están involucrados en la estimulación de la ingesta por ghrelina²². El estado nutricional afecta de manera importante la expresión hipotalámica de los neuropéptidos involucrados en la regulación de la ingesta. Se ha descrito recientemente como los niveles de ARNm de AgRP y NPY en el núcleo arcuato se incrementan tras 72 horas de ayuno. Teniendo en cuenta que el ayuno incrementa los niveles circulantes de Ghrelina esto

Figura 4. Niveles de ARNm de AgRP y NPY obtenidos mediante Técnicas de Hibridación *in situ***Figura 5.** Medidas de los niveles plasmáticos de Ghrelina en pacientes con, anorexia nerviosa (BMI < 18,5), controles (18,5 ≤ BMI < 25) y pacientes obesos (BMI ≥ 25)

parece indicar que el incremento en los niveles de ARNm de AgRP y NPY podrían estar mediados al menos en parte, por ghrelina²² (Figura 4).

Interacción entre Leptina y Ghrelina

La leptina, producto del gen *ob*, está implicada directamente en la regulación de la ingesta y peso corporal, además de regular la expresión de ARNm de NPY²⁹. El efecto saciante de la leptina se ve abolido por la coinyección de ghrelina, lo cual indica el efecto antagónico de ghrelina y leptina²⁸. Es probable que tanto la ghrelina como la leptina estén actuando a través de las mismas neuronas de NPY para regular la producción hipotalámica de NPY.

Ghrelina y regulación de la homeostasis energética

La modificación de determinados circuitos hipotalámicos podría dar lugar a alteraciones del comportamiento alimentario como la obesidad, anorexia o caquexia.

La ghrelina es un indicador de la insuficiencia energética³⁰. Varios estudios realizados en humanos, han encontrado un incremento preprandial de los niveles plasmáticos de ghrelina, así como una disminución postprandial de dichos niveles, sugiriendo estos datos que la ghrelina juega un papel fundamental en el desarrollo de la sensación de hambre e inicio de la comida^{31,32}.

La observación de que la administración de ghrelina en humanos induce sensación de hambre en un 75% de los casos³³, precipitó un interés inminente en el estudio de las acciones de esta hormona. Existe también, una elevación de los niveles de ghrelina asociados con el ayuno en roedores^{24,34}.

Los niveles de ghrelina se encuentran alterados, tanto en pacientes obesos, como en personas que han sufrido una importante pérdida de peso corporal, lo que nos lleva a pensar que esta hormona podría tener un papel importante como señal indicadora de la deficiencia energética. Estudios iniciales han demostrado como los niveles plasmáticos de ghrelina están correlacionados negativamente con el porcentaje de grasa y peso corporal³⁵ (Figura 5).

Tras una pérdida de peso inducida por la dieta, los niveles plasmáticos de ghrelina se incrementan significativamente, sugiriendo la existencia de un efecto rebote de ganancia de peso tras la dieta³².

Papel de la ghrelina en las alteraciones del comportamiento alimentario

Los niveles de ghrelina se encuentran disminuidos en sujetos obesos³⁵. En el caso de estados de malnutrición como la anorexia y caquexia, los niveles plasmáticos de ghrelina se encuentran muy elevados y en el caso de la anorexia nerviosa se

ha comprobado como la recuperación de peso normaliza los niveles plasmáticos de ghrelina hasta valores idénticos a los obtenidos en sujetos normales³⁶.

Obesidad

La obesidad es un fenotipo complejo resultante de los efectos de genes, factores de comportamiento y de las interacciones entre ellos. Los factores biológicos que regulan el balance energético son de gran importancia en el estudio de la obesidad.

Teniendo en cuenta que la ghrelina establece un puente de unión entre los sistemas reguladores para la secreción de GH y el balance energético, el estudio de la implicación de esta hormona en la obesidad es especialmente interesante.

Con respecto a la etiología de la obesidad humana, no existían informaciones sólidas que asociasen esta patología con polimorfismos en el gen de la ghrelina. Se estudiaron las secuencias de la ghrelina y preproghrelina en 96 pacientes obesos y en 96 individuos normales, se encontró que existía una mutación en el aminoácido en posición 51 (Arg51Gln) de la secuencia de la preproghrelina que corresponde con el aminoácido 28 de la ghrelina madura. Arg 51 es el blanco del corte proteolítico que da origen a la ghrelina madura. Esta mutación presenta una prevalencia del 6,3% en pacientes obesos, lo que indica que mutaciones en el gen de la ghrelina podrían jugar un papel importante en la etiopatología de la obesidad³⁷. Los niveles plasmáticos de la ghrelina son bajos en casos de obesidad humana y están asociados generalmente con un incremento de peso. La expresión de ARNm de ghrelina en el fundus gástrico de ratones *db/db*, que es un modelo de obesidad caracterizada por mutaciones en el gen del receptor de la leptina³⁸, está disminuida comparada con la expresión en ratones control³⁹. Estas alteraciones en la expresión de ghrelina podrían representar un mecanismo de adaptación fisiológica al balance energético positivo que se produce en la obesidad.

El síndrome de Prader-Willi es uno de los síndromes más comunes de obesidad genética, está causado por la ausencia de expresión de determinados genes en el brazo largo del cromosoma 15 (15q11-q13)⁴⁰.

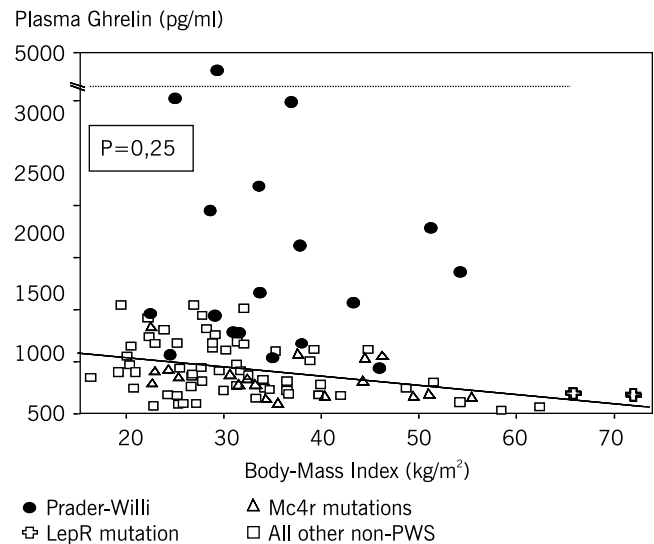
Se cree que algunas disfunciones hipotalámicas constituyen la base de algunas características típicas de este síndrome, como el apetito insaciable, la obesidad, la deficiencia de GH, hipogonadismo, control de la temperatura corporal y las alteraciones del sueño, aunque el mecanismo todavía no está muy claro⁴¹.

En pacientes adultos, con síndrome de Prader-Willi existe un incremento muy marcado de los niveles plasmáticos de ghrelina comparado con sujetos delgados y obesos⁴².

Los niveles plasmáticos de ghrelina en niños con síndrome de Prader-Willi se compararon con los niveles observados en otros tipos de obesidad, como las producidas por mutaciones del receptor de la leptina, mutaciones en el receptor 4 de melanocortina y controles (Figura 6). Los niveles plasmáticos de ghrelina en niños con Prader-Willi son muy elevados con respecto al resto de los tipos de obesidad.

Aunque en la mayoría de los modelos de obesidad los niveles plasmáticos de ghrelina están correlacionados negativamente con el índice de masa corporal, en el caso del síndrome de Prader-Willi esta correlación no ocurre, lo que pone de manifiesto que la hiperghrelinemia es la responsable de la patogénesis de la hiperfagia característica del síndrome de Prader-Willi⁴².

Figura 6. Niveles plasmáticos de ghrelina en distintos tipos de obesidad



Cummings, et al. *Nature Med* 8:643

El tratamiento de la obesidad mórbida [BMI ≥ 40 Kg/m²] con la implantación de un bypass gástrico causa una reducción muy marcada de tejido adiposo y reduce la morbilidad⁴³. Esta operación disminuye la ingesta⁴⁴, acelera la sensación de saciedad⁴⁵ y causa una disminución de la absorción de los nutrientes de la dieta, lo que da lugar a un nuevo estado de balance energético negativo⁴⁶. Recientemente se ha reportado que en un grupo de 5 pacientes sometidos a bypass se produce una disminución de los niveles de ghrelina en un 72%, lo cual podría contribuir a la reducción de peso asociada a esta intervención³².

En contraste con estos resultados existe un trabajo donde se muestra que no existen cambios significativos de los niveles de ghrelina en dos grupos de mujeres estudiados, las sometidas a bypass y las no operadas. Además, en 66 pacientes sometidos a cirugía los niveles de ghrelina se han incrementado con respecto a los observados antes de la intervención⁴⁷.

Por tanto son necesarios estudios futuros para elucidar el efecto de la cirugía gastrointestinal sobre los niveles circulantes de la ghrelina y clarificar cual es la regulación de la secreción diurna de ghrelina en pacientes tratados con bypass gástrico.

Anorexia Nerviosa

La anorexia nerviosa es un trastorno de la conducta alimentaria en la cual los pacientes presentan una idealización obsesiva del peso corporal.

Los niveles plasmáticos de la ghrelina durante el ayuno son significativamente más elevados en pacientes con anorexia nerviosa que en controles y se correlaciona negativamente con el porcentaje de grasa corporal en ambos grupos. La respuesta aguda de los niveles plasmáticos de ghrelina a la ingesta, lo cual en individuos sanos es independiente del valor calórico de la comida, no se produce en mujeres con anorexia nerviosa. Esta anomalía puede formar parte de una adaptación crónica a

la restricción de alimentos continuada, para restaurar la conducta alimentaria normal.

La caquexia es un estado catabólico caracterizado por pérdida de peso y de masa muscular, ocurre frecuentemente en pacientes con determinadas patologías como el cáncer o la enfermedad cardíaca crónica.

Los niveles de ghrelina plasmática en pacientes con caquexia son muy elevados^{48,49}. Esto podría sugerir que teniendo en cuenta el hecho de que la ghrelina actúa induciendo un balance energético positivo, el incremento de los niveles plasmático de ghrelina que se produce en pacientes con caquexia podría representar un mecanismo compensatorio del desequilibrio catabólico-anabólico típico de esta alteración.

Bulimia

La bulimia nerviosa se caracteriza por una exagerada ingesta de alimentos normalmente seguidos de episodios de vómitos.

Los pacientes con bulimia nerviosa acompañada de episodios de vómitos, presentan unos niveles plasmáticos de ghrelina mucho mayores que en los pacientes con bulimia nerviosa sin vómitos.

Se ha postulado que la hiperactividad aferente vagal podría ser un factor importante, relacionado con la patofisiología de la bulimia nerviosa⁵⁰. Se ha visto que existe un mecanismo de regulación entre los péptidos intestinales y el sistema vago. La ghrelina podría actuar como un sistema de feed-back vía vagal⁵¹. Podría ocurrir que la hiperactividad vagal aferente típica de pacientes con bulimia nerviosa estuviese incrementado los niveles circulantes de ghrelina⁵².

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el FIS y el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Red de Grupos RGTO (G03/O28), Red de Centros RCMN (C03/O8), Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento (PGIDIT02BTF91801PR), Xunta de Galicia y el Ministerio Español de Ciencia y Tecnología.

Bibliografía

- 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; 114:1531-6.
- Ghigo E, Arvat E, Muccioli G, Camanni F. Growth hormone-releasing peptides. *Eur J Endocrinol* 1997;136:445-60.
- Pong SS, Chaung LY, Dean DC, Nargund RP, Patchett AA, Smith RG. Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol Endocrinol* 1996;10:57-61.
- Casanueva FF, Dieguez C. Growth Hormone Secretagogues: Physiological Role and Clinical Utility. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:30-8.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 1992;11:1-20.
- McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, et al. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 1997; 11:415-23.
- Smith RG, Van Der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 1997;18:621-45.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;48:23-9.
- 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.
- Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:325-38.
- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 2003;278:64-70.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. 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.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003;37:649-61.
- Gualillo O, Caminos J, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001;142:788-94.
- Caminos JE, Nogueiras R, Blanco M, Seoane LM, Bravo S, Alvarez CV, et al. Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 2003; 144:5089-5097.
- Tivesten A, Caidahl K, Kujacic V, Sun XY, Hedner T, Bengtsson BA, Isgaard J. Similar cardiovascular effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I in rats after experimental myocardial infarction. *Growth Horm IGF Res* 2001;11:187-95.
- Seoane LM, Tovar S, Baldelli R, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol* 2000;143:R7-R9.
- Peino R, Baldelli R, Rodríguez-García J, Rodríguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 2000;143:R11-R14.
- Kamegai J, Wakabayashi I, Kineman RD, Frohman LA. Growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) and growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels during postnatal development in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 1999;11:299-306.
- Kineman RD, Kamegai J, Frohman LA. Growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692,585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1999;140:3581-6.
- Tolle V, Zizzari P, Tomasello C, Rio MC, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 2001;73:54-61.
- Seoane LM, Lopez M, Tovar S, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 2003;144:544-51.
- Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1169-74.

24. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407:908-13.
25. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, *et al.* Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001;120:337-45.
26. Torsello A, Locatelli V, Melis MR, Succu S, Spano MS, Deghenghi R, *et al.* Differential orexigenic effects of hexarelin and its analogs in the rat hypothalamus: indication for multiple growth hormone secretagogue receptor subtypes. *Neuroendocrinology* 2000;72:327-32.
27. Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? *Cancer Res* 1999;59:4493-501.
28. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, *et al.* 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;50:227-32.
29. 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.
30. Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschop M. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 2001;142:4163-9.
31. 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.
32. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002;346:1623-30.
33. Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, *et al.* Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest* 2000;23:493-5.
34. Wisse BE, Frayo RS, Schwartz MW, Cummings DE. Reversal of cancer anorexia by blockade of central melanocortin receptors in rats. *Endocrinology* 2001;142:3292-301.
35. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001;50:707-9.
36. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, *et al.* Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001;145:669-73.
37. Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Snyder EE, Chagnon M, Sjostrom L, Bouchard C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3996-9.
38. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* 1996;84:491-5.
39. Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, *et al.* Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1220-5.
40. Cassidy SB, Dykens E, Williams CA. Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet* 2000;97:136-46.
41. Swaab DF. Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. *Acta Paediatr Suppl* 1997;423:50-4.
42. Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 2002;8:643-4.
43. Sjostrom L. Surgical intervention as a strategy for treatment of obesity. *Endocrine* 2000;13:213-30.
44. Halmi KA, Mason E, Falk JR, Stunkard A. Appetitive behavior after gastric bypass for obesity. *Int J Obes* 1981;5:457-64.
45. Trostler N, Mann A, Zilberbush N, Avinoach E, Charuzi I. Weight Loss and Food Intake 18 Months following Vertical Banded Gastroplasty or Gastric Bypass for Severe Obesity. *Obes Surg* 1995;5:39-51.
46. Brolin RE, LaMarca LB, Kenler HA, Cody RP. Malabsorptive gastric bypass in patients with superobesity. *J Gastrointest Surg* 2002;6:195-203.
47. Holdstock C, Engstrom BE, Ohrvall M, Lind L, Sundbom M, Karlsson FA. Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: effect of gastric bypass surgery in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3177-83.
48. Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, *et al.* Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* 2003;9:774-8.
49. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, *et al.* Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 2001;104:2034-8.
50. Faris PL, Kim SW, Meller WH, Goodale RL, Oakman SA, Hofbauer RD, *et al.* Effect of decreasing afferent vagal activity with ondansetron on symptoms of bulimia nervosa: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2000;355:792-7.
51. Uvnas-Moberg K. Release of gastrointestinal peptides in response to vagal activation induced by electrical stimulation, feeding and suckling. *J Auton Nerv Syst* 1983;9:141-55.
52. Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiya T, Nakazato M, *et al.* Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2002;146:R1-R3.