



Grelina: Una hormona reguladora de la ingesta de alimento y del peso corporal

Ghrelin: a regulatory hormone of food intake and body weight

Elvira Morgado Viveros¹,
Mario Salvador Caba Vinagre².

RESUMEN

El peso corporal depende del equilibrio entre la ingesta y el gasto energético. Cuando la ingesta excede al gasto aparece la obesidad, una enfermedad que acaba con millones de vidas en todo el mundo. La ingesta de alimento está regulada por un sistema complejo que incluye tanto factores centrales como periféricos. La grelina es una hormona gastrointestinal identificada como un potente regulador de la alimentación y control del peso corporal. La secreción de grelina es prominente antes de la hora de comida y decrece después de la ingesta, en individuos bajo horarios regulares de alimentación. La administración periférica de grelina fortalece el hambre y la ingesta de comida. Los niveles plasmáticos de esta hormona en individuos obesos están elevados y se elevan, aún más, a consecuencia de dietas y cirugías para reducir de peso. Con base en estudios relacionados con la función y mecanismos de acción de la grelina, la industria farmacéutica se ha interesado en desarrollar un antagonista del receptor de grelina que pueda funcionar en la terapia contra la obesidad. Entre los métodos estudiados el más promisorio es la inmunización del organismo contra la grelina. El desarrollo de una vacuna contra esta hormona promete ser un importante tratamiento para controlar el peso y la obesidad. En la presente revisión describimos la fisiología de la grelina y los estudios que hemos realizado sobre esta hormona utilizando al conejo como modelo. Además, discutimos la posible importancia terapéutica de esta hormona como regulador del peso corporal en humanos. **Palabras clave:** Grelina, ingesta de alimento, ciclo hambre-saciedad, obesidad.

ABSTRACT

Body weight depends on the balance between energy intake and energy expenditure, when the intake is greater than expenditure obesity appears, a disease that endangers the lives of million of people worldwide. Food intake is regulated by a complex system that includes both central and peripheral factors. Ghrelin, a gastrointestinal peptidic hormone, is a potent regulator of food intake and body-weight. Subjects under fixed feeding schedules display an increase of ghrelin secretion before mealtime, and decreases after food intake. Peripheral administration of ghrelin promotes hunger and food intake. In addition, plasma ghrelin levels are elevated in obese subjects, and become even more elevated after diets and surgeries aimed to lose weight. Based on studies describing the function and action of ghrelin, pharmaceutical companies have become interested on developing a ghrelin receptor antagonist that might help to treat obesity. Among the therapeutic strategies to control body weight and obesity, immunization against ghrelin seems to be one of the most promising. In this review we describe the physiology of ghrelin and studies of this hormone conducted in our laboratory, using the rabbit as a model. We also discuss the possible therapeutic importance of this hormone to control body weight in humans.

Key words: Ghrelin, food intake, hunger-satiation cycle, obesity.

¹Maestra en Ciencias

²Doctor en Ciencias

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana.

Fuente de apoyo

Fogarty/National Institutes of Health, R01TW006636-01 (M.Caba)

Correspondencia:

Mario Caba

Laboratorio de Biología de la Reproducción, IIB, Universidad Veracruzana

Tel. 8-41-8900 ext. 13405

mcaba@uv.mx

A.P.114, Xalapa, Ver.

LOS CICLOS DE HAMBRE-SACIEDAD

La alimentación es una conducta de suma relevancia para los seres vivos, debido a que la energía requerida para el funcionamiento celular proviene de los nutrimentos contenidos en los alimentos que el organismo ingiere. Esta conducta ha sido influenciada por procesos evolutivos y adaptativos, que han permitido que los organismos desarrollen estrategias para mantener la homeostasis celular. De este modo, no es necesario que los organismos mantengan un proceso de alimentación continua, siempre y cuando sean capaces de mantener el aporte energético, aun en periodos de ayuno, entre una ingesta y otra.

Desde el punto de vista fisiológico, la ingesta de alimento esta regulada por un sistema complejo que involucra tanto factores centrales (a nivel de cerebro y médula espinal y de las sustancias que ahí se producen) como periféricos (que incluye a casi todos los órganos del cuerpo y los productos que segregan). El equilibrio entre la energía ingerida a través de los alimentos y la energía gastada por el metabolismo celular da como resultado el buen funcionamiento del organismo. Los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, son las tres grandes categorías de macronutrientes que usualmente proveen de energía calórica a las células. Dependiendo de las funciones del tejido, la célula hace uso específico de cada uno de los macronutrientes. Así, desde el punto de vista energético, la principal fuente de energía es el carbohidrato glucosa y su forma polimérica de almacenaje como glucógeno, de modo tal que los organismos tienen mecanismos homeostáticos para mantener estables los niveles sanguíneos de glucosa. Es claro que el balance energético se preserva a partir de la ingesta de alimentos, la cual se controla a dos niveles: uno opera a corto plazo, determinando las reservas de carbohidratos del organismo e impulsando a la búsqueda de calorías cuando las reservas de glucógeno o los niveles de glucosa descienden; el otro opera a largo plazo y está más relacionado con la utilización de los depósitos grasos del tejido adiposo, y promueve la ingesta de alimento a mediano y largo plazo.¹

Los mecanismos de hambre-saciedad regulan la ingesta de alimento, entendiendo por hambre como una sensación fisiológica que indica al individuo la necesidad de ingerir alimentos, en tanto que saciedad es la sensación de no requerir comida durante cierto tiempo. Durante la fase de hambre, el individuo esta motivado a la búsqueda de alimento, mientras que durante la saciedad desaparece la motivación para comer. La alternancia de estos ciclos de hambre-saciedad regula la homeostasis energética, lo que requiere una coordinación precisa entre los sensores de nutrientes periféricos y las redes de regulación central.²

La sensación de hambre está regulada por un sistema de múltiples señales periféricas que comunican al cerebro, el estado energético en el que se encuentra el organismo. Usualmente

esas señales periféricas se clasifican como efectoras a largo y a corto plazo. Por ejemplo, las hormonas leptina e insulina con acción reguladora del peso corporal, pertenecen a las de largo plazo, indicando adiposición, es decir capacidad de almacenar grasas. Por parte de las que pertenecen a la categoría de efecto a corto plazo, están los factores gastrointestinales: contenido de nutrimentos, distensión gástrica, secreción de colesistoquinina y grelina, estos actúan como señal de inicio de ingesta de alimentos y de saciedad posprandial.³ En esta revisión enfocaremos la atención al péptido gastrointestinal grelina debido a que hasta ahora, es la única hormona orexigénica (que estimula el hambre) circulante conocida que tiene un potente control no sólo sobre el hambre sino también sobre el peso corporal, es decir se trata de una señal de acción tanto a corto como a largo plazo.

LA GRELINA

Inicialmente se describió a la grelina como un ligando endógeno del receptor secretagogo de la hormona de crecimiento y fue hasta más tarde cuando se descubrió el poderoso rol que tiene sobre la homeostasis energética. Es un péptido residual formado por 28 aminoácidos, producido principalmente en el estómago por las células del fundus,⁴ aunque también hay secreción desde intestino, páncreas, riñones, pulmón, placenta, testículos, pituitaria e hipotálamo.⁵ La grelina producida por el estómago es transportada a través del torrente sanguíneo, ligada a lipoproteínas de alta densidad y posiblemente a albúmina. Recientemente se demostró que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica,⁶ por lo cual es capaz de actuar sobre circuitos neuronales centrales implicados en la ingesta de alimento y gasto de energía, situados en hipotálamo y en tallo cerebral. Se ha demostrado que actúa sobre el núcleo arcuato donde activa células de neuropéptido Y,⁷ un potente estimulador de ingesta de alimento a nivel central. El núcleo arcuato se localiza en el hipotálamo, una región del cerebro involucrada en el control de la temperatura, la conducta sexual y el hambre y la saciedad, entre otras conductas.

La grelina influye sobre el metabolismo de la glucosa y del balance de energía, el metabolismo óseo, la función pancreática, la motilidad gastrointestinal, la secreción de ácido gástrico, la función cardiovascular, el sistema inmune y la proliferación y supervivencia celular.⁵ También se ha demostrado su influencia sobre la memoria⁸ y el sueño.⁹ A pesar de sus múltiples funciones, el interés actual en esta hormona radica en su potente valor orexigénico y de adiposición.

La administración central y periférica de grelina incrementa la ingesta de alimento y reduce la utilización de grasas, lo cual induce acumulación de tejido adiposo y ganancia en el peso corporal.¹⁰ En ratas,¹¹ humanos,¹² ovejas,¹³ vacas¹⁴ y

perros¹⁵ se ha demostrado que la secreción de grelina aumenta antes de comer (preprandialmente) y disminuye después de comer (postprandialmente). Es decir, bajo un régimen de alimentación con horarios fijos, la concentración de grelina circulante incrementa justo antes de la hora de ingesta de alimento y disminuye al finalizar la comida. Además, en condiciones de ayuno prolongado, los niveles de grelina se incrementan y permanecen así hasta una nueva ingesta de alimento o por infusión de nutrientes en el estómago.¹² Dicho de otra manera, los principales efectos de la grelina sobre la ingesta de alimento es indicar hambre e incrementar la motivación del individuo para buscar alimento y comer. La grelina estimula la ingesta de alimento tanto en individuos obesos como en delgados, lo que indica que su secreción responde de modo compensatorio a las alteraciones en el peso corporal, es decir, actúa ante la pérdida y ante la ganancia de peso.

La mayoría de los estudios en los que se ha analizado la secreción de grelina, bajo un régimen controlado de horarios de alimentación, se han realizado en ratas, lo que obliga a realizar una constante manipulación de los individuos, que incluye la alternancia de períodos de presencia y ausencia de alimento. El conejo neonato o gazapo representa un modelo alternativo, ideal para estudiar este fenómeno debido a que se alimenta, de manera natural, una sola vez al día.

ESTUDIO DE LA GRELINA EN CONEJOS NEONATOS

El único momento de interacción entre los gazapos y su madre es la visita de la coneja al nido para lactar a su camada, actividad que realiza en espacios que van de tres a cinco minutos cada 24 horas.¹⁶ Durante este corto período de interacción, los gazapos ingieren hasta un 35% de su peso corporal en leche en el día siete de edad.¹⁷ Durante la mayor parte del tiempo los críos se mantienen quiescentes con el objetivo de no gastar energía hasta la siguiente sesión de alimentación, sin embargo despliegan un incremento en su actividad entre dos y tres horas antes de la llegada de la madre, lo que les prepara para la captura del pezón materno.^{16,18}

Considerando que la secreción de grelina es una señal de hambre y de ingesta de alimento, pensamos que esta hormona estaría incrementada justo antes del amamantamiento de los gazapos y que sus niveles decrecerían después de su ingesta de leche. Además que en condiciones de ayuno prolongado, los niveles de dicha hormona se mantendrían elevados.

Para comprobar estas hipótesis, realizamos un estudio¹⁹ en el cual establecimos una hora predeterminada para el acceso de la madre al nido con el fin de alimentar a los gazapos. Así, la hembra alimentó a sus críos a las 10:00 horas desde el día uno

hasta el día siete de edad; en este día se procedió a la toma de muestras sanguíneas justo antes de la ingesta y cada 4 horas a partir de ésta, hasta completar un ciclo de 24 horas. Un segundo grupo se dejó en ayuno prolongado: estos gazapos ingirieron leche hasta el día 7 de edad y fueron privados de las dos sesiones de alimentación siguientes. A partir de las 48 horas de ayuno (cumplidas a las 10:00 horas del día 9 de edad) se inició la toma de muestras sanguíneas cada 4 horas completando un ciclo de 24 horas. Además de las muestras sanguíneas para el análisis de grelina en suero, medimos también la glucosa plasmática y determinamos el peso estomacal de cada gazapo experimental.

Los resultados obtenidos de este estudio¹⁹ no fueron consistentes con las hipótesis inicialmente planteadas. Aunque hay una ligera elevación de grelina plasmática, en el momento justo antes de la comida, el pico máximo de secreción se observó 12 horas después de la ingesta de leche. Sin embargo, analizando el peso estomacal de los gazapos en cada punto temporal experimental, pudimos notar que estos sujetos tienen un súbito llenado estomacal y que, al cabo de 12 horas después de la ingesta de leche, es vaciado cerca de un 70% de su peso máximo. El vaciado de la mayor parte del estómago coincidió con el máximo nivel de secreción de grelina, lo que podría ser una señal para la secreción de dicha hormona por el tubo digestivo y ésta, a través de su acción en el cerebro, estimularía la ingesta de alimento para el siguiente ciclo. En términos generales consideramos que puede ser una señal para iniciar el estado post-absortivo el cual puede conducir al siguiente período de ingesta de alimento.

En cuanto al grupo de gazapos que se mantuvieron en ayuno por más de 48 horas, los niveles de grelina permanecieron elevados durante todo el período de muestreo. No se observó el pico máximo a la mitad del ciclo y el peso estomacal permaneció constantemente disminuido, como consecuencia de la privación de leche por más de 48 horas, lo que refuerza la idea de la relación entre el vaciado estomacal y la secreción de grelina. Nuestros resultados coinciden con datos aportados por estudios anteriores en varias especies de mamíferos sometidos a ayuno prolongado, lo cual es interpretado como que los sujetos están hambrientos.^{10,12} Cabe mencionar que los niveles de glucosa permanecieron constantes a pesar de que los gazapos se mantuvieron en ayuno prolongado, lo que se explica a partir de su capacidad para mantener la cascada metabólica de manera similar a individuos que tienen alimentación constante.

Un análisis detallado de la literatura indica que la idea inicial de una elevación preprandial, seguido de una disminución postprandial de grelina, no siempre se cumple ya que su regulación es mucho más compleja. Estudios recientes indican que su disminución depende del contenido nutricional del alimento.^{20,21,22} Esto se ha postulado al observar una disminución

postprandial inducida por alimento alto en carbohidratos^{20,22} que no es replicada cuando la ingesta es rica en proteínas²¹ y menos aún si la comida fue alta en lípidos.²² Aún no se ha determinado si los nutrientes tienen un efecto directo sobre la modulación de la expresión de la grelina o si el efecto está mediado por hormonas metabólicas.

Por otra parte, Murakami y colaboradores¹¹ analizaron el patrón diurno de los niveles plasmáticos de grelina en ratas con alimentación *ad libitum*, (condición regular en la que normalmente se tienen los sujetos experimentales bajo condiciones de laboratorio) y observaron que el patrón de secreción de la grelina es bimodal, es decir, un pico en la fase de luz y otro en la fase de oscuridad. El volumen de contenido gástrico mostró un ritmo similar, con un incremento en la fase de oscuridad y un decremento observado en la fase de luz. Los picos de grelina durante la fase de oscuridad y durante el periodo de luz, son consistentes con el volumen más alto y más bajo de contenido gástrico, respectivamente. Esto indica nuevamente, que la secreción de grelina está incrementada bajo condiciones tanto de llenado como de vaciado estomacal. Una posible explicación sobre la función que pudieran tener ambos picos es que en oscuridad estimula la ingesta de alimento y durante el período de luz estimula la secreción de ácido gástrico,²³ lo que prepara al tracto gastrointestinal para un transporte y procesamiento efectivo de los alimentos.

En conjunto, basándonos en la literatura y en los datos de nuestro laboratorio, la evidencia indica que la grelina es una hormona clave en el proceso de hambre-saciedad y confirma lo reportado por otros laboratorios^{11,23} en el sentido de que su secreción está estrechamente asociada a los procesos de llenado y vaciado estomacal.

LA GRELINA COMO UNA HERRAMIENTA TERAPÉUTICA CONTRA LA OBESIDAD

La obesidad es una importante enfermedad de salud pública que día a día termina con la vida de muchas personas, principalmente occidentales. Es una condición patológica en la cual se exceden las reservas naturales de energía almacenadas en el tejido adiposo. Aproximadamente un billón de personas en el mundo tienen sobrepeso u obesidad, siendo los países desarrollados donde se concentra la mayoría de esta población. Se considera que una persona tiene sobrepeso cuando su índice de masa corporal (IMC) es mayor de 25 y como persona obesa aquella cuyo IMC es mayor de 30; el IMC se calcula dividiendo el peso corporal en Kg sobre la estatura en m².²⁴ Las personas obesas incrementan significativamente sus riesgos de mortalidad ya que existe un gran número de condiciones médicas asociadas a la obesidad, las principales son: diabetes mellitus tipo 2,

hipertensión, apnea del sueño, enfermedades cardiovasculares, aumento de colesterol y triacilglicéridos en sangre, entre muchas más. Las causas de la obesidad son múltiples, incluyen factores genéticos, nerviosos, endócrinos y metabólicos y sobre todo el tipo o estilo de vida que se lleve.

Durante muchos años Estados Unidos de Norteamérica ha ocupado el primer lugar en casos de obesidad seguido por México. Aproximadamente el 70 % de los mexicanos padecen obesidad o sobrepeso, lo que contribuye a entender porque las causas de muerte en México han dejado de ser por infecciones y ahora son por enfermedades cardiovasculares y diabetes. Además, durante los últimos años se ha desarrollado un importante problema de salud pública en México: la obesidad infantil; uno de cada tres niños mexicanos padece esta enfermedad, atribuida principalmente a la dieta alta en grasas y a la vida sedentaria que cada vez se fomenta más entre los infantes.²⁵ Estas cifras son realmente alarmantes por su impacto en la disminución de la esperanza de vida.

Con base en los estudios que se han realizado a cerca de la función y mecanismos de acción de la grelina, surge la idea de implementar un método que pudiera modular específicamente la biodisponibilidad de esta molécula que regula el balance de energía, con el objetivo de encontrar un tratamiento para la obesidad, más efectivo que los existentes. Se ha propuesto que la grelina también tiene una función anabólica; esta hipótesis fue consistente con los resultados obtenidos a partir de ratones deficientes en grelina o en su receptor, en los que se observó disminución en la ingesta de alimento, incremento en su gasto energético y resistencia a la acumulación de peso y grasa corporal, a pesar de que su dieta era alta en grasas.²⁶

Teniendo en cuenta el grave problema de salud mundial que representa la obesidad, diversos laboratorios y empresas farmacéuticas en el mundo encaminan esfuerzos a la investigación sobre esta hormona, centrando la atención en desarrollar métodos inmunológicos para el control de peso y la obesidad en humanos. Para modular la acción de la grelina, Zorrilla y colaboradores²⁷ emplearon el novedoso método de inmunofarmacoterapia cuya finalidad es crear anticuerpos que se unan a la grelina periférica impidiéndole su acceso al cerebro, donde ejerce su función orexigénica. En este experimento con ratas, probaron tres haptenos inmunoconjugados de grelina (Ghr1, Ghr2 y Ghr3) como potenciales vacunas anti-grelina, de los cuales Ghr1 y Ghr3, produjeron buena respuesta inmune. Las ratas inmunizadas con estos dos haptenos tuvieron poca ganancia de peso corporal, sin reducir su ingesta de alimento. Pese a las limitantes que en este importante trabajo expresan, queda clara la evidencia de que bloqueando la señalización de la grelina, se reduce la ganancia de peso corporal. Los autores mencionan el compromiso de dirigir futuros experimentos a la

comprobación de estos resultados, a perfeccionar la eficacia del método y aplicarlo a otras moléculas potencialmente anabólicas. Además es necesario probar su eficacia y durabilidad, aunque es sabido que la inmunización es un efecto permanente.²⁴ Este método no sería útil sólo para combatir la obesidad, sino también para ayudar contra los problemas de la anorexia (otro desorden alimentario que día a día acaba con la vida de cientos de jóvenes, principalmente) debido a que pacientes con esta enfermedad también tienen concentraciones altas de grelina plasmática.²⁰

La empresa suiza *Cytos Biotechnology* está dedicada al descubrimiento, desarrollo y comercialización de las llamadas inmunodrogas (vacunas terapéuticas dirigidas al tratamiento y prevención de las enfermedades crónicas más comunes). En el 2005, esta empresa inició el desarrollo de la vacuna anti-grelina, la cual falló en la fase III de las pruebas clínicas, debido a que no se alcanzó una pérdida de peso significativa. Sin embargo esta empresa continúa apoyando la investigación sobre el mecanismo de acción de la grelina para lograr exitosamente el desarrollo de dicha vacuna debido a que la inmunofarmacoterapia promete ser un método viable para el control de la obesidad.²⁸ Sin embargo, un fuerte inconveniente de este tratamiento sería que podrían causarse importantes alteraciones fisiológicas, por ejemplo problemas de aprendizaje y memoria, gastrointestinales y cardiovasculares, debido a que como se mencionó inicialmente, la grelina está implicada en múltiples procesos. Al estar inhibida la grelina, es muy posible que los procesos sobre los que tiene influencia se vieran alterados, como se ha demostrado en ratones Ghrl (-/-), los cuales presentan un control de peso similar a la de ratones Ghrl (+/+). Sin embargo, en este estudio reportan evidencia de la importancia de la grelina para determinar el tipo de sustrato metabólico (carbohidratos o grasa) que se utilizará para preservar el balance energético.²⁹

La investigación, el correcto desarrollo y posterior comercialización de un método inmunofarmacéutico contra la obesidad, como lo es la inmunización a la grelina, podría ser de potencial relevancia para combatir esta epidemia. Es importante tener en cuenta que esta vacuna aún está en pruebas para su desarrollo, por lo que se desconocen sus potenciales efectos secundarios en humanos. Sin embargo, el hecho de que las compañías farmacéuticas estén interesadas en ella, promete que en el futuro sabremos si efectivamente resulta útil para los humanos. Una vez realizadas las investigaciones correspondientes que permitan conocer a profundidad los efectos secundarios de esta vacuna y los métodos para contrarrestarlos, la inmunización a la grelina será un método relativamente fácil de efectuar por parte de los pacientes que promete alta efectividad y que superará a los tratamientos hasta ahora utilizados contra la obesidad: dietas, ejercicio, administración de drogas y cirugías,

que resultan difíciles de efectuar por los pacientes debido a múltiples factores que incluyen motivación, voluntad, economía y disponibilidad del método.

Aunque falta abundante información acerca del mecanismo de acción de la grelina, la vacunación contra la obesidad ofrece ser un tratamiento fácil de llevar. De modo tal, que al ser la obesidad un problema de salud pública, las instituciones gubernamentales pertinentes podrían hacerla accesible a toda la población.

BIBLIOGRAFÍA

1. Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O. Alimentación y balance energético. En: Escobar C, Aguilar-Roblero R, editores. Motivación y conducta: sus bases biológicas. México, D.F.: El manual moderno; 2002. pp. 169-88.
2. Escobar C. Hambre y saciedad. En: Escobar C, Aguilar-Roblero R, editores. Motivación y conducta: sus bases biológicas. México, D.F.: El manual moderno; 2002. pp. 57-77.
3. Cummings DE. Ghrelin and the short- and long term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 2006; 89:71-84.
4. Date Y y col. 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.
5. van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endoc Rev* 2004; 25:426-57.
6. 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; 302:822-7.
7. Nakazato N. y col. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409:194-8.
8. Diano S. y col. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature Neurosci* 2006; 9:381-8.
9. Bodosi B. y col. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2004; 287:R1071-9.
10. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407:908-13.
11. Murakami N. y col. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol* 2002; 174:283-8.
12. Cummings DE. y col. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggest a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50:1714-9.
13. Sugino T. y col. A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298:785-8.
14. Miura H. y col. Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. *J Anim Sci* 2004; 82:1329-33.
15. Yokoyama M. y col. Influencing the between-feeding and endocrine responses of plasma ghrelin in healthy dogs. *Eur J Endocrinol* 2005; 152:155-60.
16. Jilge B. Ontogeny of the rabbit's rhythms without an external zeitgeber. *Physiol Behav* 1995; 58:131-40.
17. Caba M, Rovirosa MJ, Silver R. Suckling and genital stroking induces Fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons of rabbit pups. *Dev Brain Res* 2003; 143:119-28.

18. Caba M. y col. Nature's food anticipatory experiment: entrainment of locomotor behavior, suprachiasmatic and dorsomedial hypothalamic nuclei by suckling in rabbit pups. *Eur J Neurosci* 2008; 27: 432-43.
19. Morgado E. y col. Hormonal and metabolic rhythms associated with the daily scheduled nursing in rabbit pups. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295:R690-5.
20. Shiiya T. y col. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:240-4.
21. Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 2003; 116:101-7.
22. Monteleone P. y col. Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5510-4.
23. Date Y. y col. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 904-7.
24. Carlson MJ, Cummings DE. Prospects for an anti-ghrelin vaccine to treat obesity. *Mol Interv* 2006; 6:249-52.
25. <http://www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres/EDC3D762-9DF4-4013-8F1438F0FA5B6857/0/060708Com261.doc>
26. Zigman JM. y col. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115:3564-72.
27. Zorrilla EP. y col. Vaccination against weight gain. *PNAS* 2006; 103:13226-31
28. http://www.cytos.ch/doc/Cytos_Press_050511_E.pdf
29. Wortley KE y col. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004; 101:8227-8232.