Universidade de Santiago de Compostela

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Efecto de ghrelin, des-acil ghrelin y obestatina sobre la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario

MEMORIA

Que presenta para optar al Grado de Doctora en Biología

María Jesús Iglesias Mareque

Santiago de Compostela, 2006

El Dr. José Ramón González Juanatey, Catedrático en Medicina del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, y la Dra. María Francisca Lago Paz, Investigadora contratada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

CERTIFICAN QUE:

La presente memoria titulada, "Efecto de ghrelin, des-acil ghrelin y obestatina sobre la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario", que presenta María Jesús Iglesias Mareque para optar al Grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo nuestra dirección en la Unidad de Investigación en Cardiología Celular y Molecular (CCM) del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, y autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, se firma el presente certificado en Santiago de Compostela, Abril 2006.

Fdo: Dr. José Ramón González Juanatey **Fdo: Dra. María Francisca Lago Paz**

Fdo: Dña. María Jesús Iglesias Mareque

A mi familia, que me da vida.

En primer lugar me gustaría agradecer a Mis Directores de Tesis, Ramón y Fran, la oportunidad que me han ofrecido para desarrollar este trabajo. Siempre se aspira a unas metas y vosotros me habéis aportado importantes puntos base, en mi desarrollo profesional y personal, para poder llegar a ellas. Y por supuesto, sin vosotros nada habría sucedido.

A Rober porque eres un estupendo amigo y compañero. Eres mi gran apoyo en el laboratorio y desde que llegué tuviste que soportarme en mayor medida que el resto, pero no me he portado tan mal, bueno, solo a veces. Te deseo lo mejor porque te lo mereces.

A Ángel, Isa, Miguel y Eva por teneros siempre cerca y sobre todo por las risas, confidencias y amistad que me ofrecéis, que es lo mejor que me llevo de vosotros.

A Mónica, eres una gran persona y mejor amiga. Realmente no tengo palabras para darte las gracias por todo el cariño que me das.

A Lilian, mi torbellino, ya me gustaría tener ese ímpetu y calma a la vez, tanto en el trabajo como en la vida. Tú sí que eres un sol.

A mi Montse y Carliños, por nuestros buenos momentos culinarios y por otros muchos que pasamos, y a pesar de que los tengo algo abandonados aún siguen animándome, eso son los buenos amigos.

A mis compañeros Carlos, Patricia y Sonia por los buenos momentos y la ayuda dentro de nuestro laboratorio. A los nuevos fichajes, ánimo en la nueva aventura.

Agradecer a todos mis compañeros de los Laboratorios de Investigación del Hospital, de los Departamentos de Fisiología y Endocrinología, con un gran cariño, el haber estado por ahí pululando y cacharreando conmigo durante el desarrollo de este trabajo. Y en especial a Edu, Rubén, Susana, Suly, Martita, Sisi, Kitos y Mary.

A Oreste (yes), Antonio y Carmen, por el día a día y lo que se puede aprender de los directores de los laboratorios vecinos, y por su puesto por los sobaos de Santander, ¡qué vicio!

Al Dr. Carlos Diéguez, del Departamento de Fisiología, por haber sido mi tutor en los inicios de esta etapa y por todos sus consejos.

Al Dr. Felipe Casanueva, Dr. Jesús Camiña y Dr. Tomás García-Caballero, de los Departamentos de Medicina y Ciencias Morfológicas, por su colaboración en partes del desarrollo de esta Tesis.

A mis padres, mis hermanos Berto y Coki, mis "hermanas" Almu y Rebe, que siempre me ofrecéis cariño y apoyo constante aun a pesar de que a veces no entendéis el porqué de este camino elegido o el tiempo de dedicación necesario para realizar este trabajo. No me olvido de mis padrinos, la familia de Conxo y Buenos Aires, por preguntar ¿Cómo van esos bichos teus?

A mi Chusiño, el que tú estés metido en este mundillo me ha ayudado mucho. Para mi es muy importante cada momento vivido contigo, porque siempre estás para arroparme, ayudarme, hacerme reír, ser mi cómplice, atc. Además eres el espejo en el que me puedo mirar y el que me retará cada día.

En fin, como en cada momento de nuestras vidas tenemos un pie en el cuento de hadas y otro en el abismo, vamos a dar comienzo.

Índice

I. Introducción

Introducción 3

Descubrimiento de ghrelin 4

Estructura génica 4

Estructura proteica 7

Aislamiento y caracterización 8

Distribución tisular 14

Secretagogos de GH 17

Receptor de secretagogos de GH 19

Funciones Biológicas de Ghrelin 23

⦿ Regulación de la secreción de GH 23

⦿ Regulación de la movilidad y secreción gástrica 26

⦿ Regulación del balance energético y homeostasis metabólica 26

a) Regulación de la ingesta 26

b) Balance energético y metabolismo 28

c) Ghrelin y desórdenes metabólicos 29

⦿ Regulación del metabolismo de la glucosa 30

a) Efecto de la glucosa e insulina sobre ghrelin 31

b) Efecto de ghrelin sobre el metabolismo de la glucosa e insulina 32

⦿ Regulación de la proliferación celular 34

⦿ Regulación de la función cardiovascular 35

a) Parámetros hemodinámicos 36

b) Cardioprotección 38

c) Experimentos con cardiomiocitos aislados 38

d) Actividad cardiovascular de Des-acil ghrelin 40

Modelos knockout y transgénicos 40

II. Justificación y Objetivos

Justificación y objetivos 45

III. Material y Métodos

Cultivos celulares 49

⦿ Células HL-1 49

⦿ Cultivo primario de cardiomiocitos humanos 50

Tratamientos celulares en la línea celular HL-1 51

⦿ Análisis de la actividad metabólica 51

⦿ Análisis del ciclo celular 51

⦿ Estudios de apoptosis celular 51

⦿ Análisis del metabolismo de lípidos 52

⦿ Estudio del metabolismo de la glucosa 53

Técnicas analíticas 53

⦿ Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica 53

⦿ Determinación de expresión génica mediante RT-PCR 56

Extracción de ARN mensajero 56

Reacción de retrotranscripción (RT) 58

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 59

⦿ Southern blot 59

⦿ Secuenciación 60

⦿ Estudios de unión ligando-receptor 61

⦿ Medida del calcio intracelular 63

⦿ Radioinmunoensayo 64

⦿ Ensayos de actividad metabólica (MTT) 66

⦿ Citometría de flujo 66

⦿ Tinción vital Hoechst 33258 67

⦿ Ensayos de captación de ácidos grasos 68

⦿ Ensayos de captación de glucosa 68

⦿ Western Blot 70

⦿ Análisis estadístico 73

➢ Tabla 1 74

IV. Resultados

Ghrelin, Des-acil ghrelin y GHS-R

Expresión de ghrelin en cardiomiocitos 77

Síntesis de ghrelin en cardiomiocitos 79

Secreción de ghrelin por cardiomiocitos 79

Expresión del receptor de secretatogos de GH en cardiomiocitos 82

Estudio de unión ligando-receptor en células HL-1 82

Ensayo de movilización de calcio intracelular 84

Regulación de la expresión de ghrelin 84

Ghrelin y Des-G y viabilidad cardiomiocitaria de las células HL-1 87

Estudio del papel de ghrelin y Des-G en el metabolismo de lípidos 87

Estudio del papel de ghrelin y Des-G en el metabolismo de la glucosa 91

Estudio de la posible interacción de las rutas metabólicas de ghrelin, Des-G y la insulina 92

Obestatina y GPR39

Expresión del receptor de obestatina (GPR39) en cardiomiocitos 96

Estudio de unión ligando-receptor en células HL-1 96

Obestatina y viabilidad cardiomiocitaria 96

Estudio del papel de la obestatina en el metabolismo de lípidos 97

Estudio del papel de la obestatina en el metabolismo de la glucosa 97

V. Discusión

1. Expresión de ghrelin y su receptor en cardiomiocitos 105

1.1 Ghrelin 105

1.2 Receptor de ghrelin 108

2. Efecto de ghrelin y Des-G sobre la viabilidad cardiomiocitaria 110

2.1 Actividad metabólica 110

2.2 Apoptosis 111

3. Efecto de ghrelin y Des-G sobre el metabolismo cardiomiocitario 113

3.1 Efecto de ghrelin y Des-G sobre el metabolismo de lípidos 114

3.2 Efecto de ghrelin y Des-G sobre el metabolismo de la glucosa 114

3.3 Efecto de ghrelin y Des-G sobre la ruta intracelular de la insulina 117

4. ¿Son los efectos de ghrelin y Des-G similares, o se contraponen? 117

5. Papel de la obestatina sobre la viabilidad y metabolismo cardiomiocitario 118

6. Resumen 119

VI. Conclusiones

Conclusiones 123

VII. Bibliografía

Bibliografía 127

Introducción

Introducción

Desde hace más de dos décadas se han utilizado compuestos sintéticos, los secretagogos de GH (GHS), para estimular de forma farmacológica la secreción de hormona de crecimiento (GH) en individuos con alteraciones del eje hipotálamo-hipofisario, y principalmente en individuos con déficit en GH (Chapman y col., 1996; Carpino, 1999).

Con el descubrimiento de ghrelin se dio a conocer una nueva vía endocrina de gran interés. Este nuevo péptido, de 28 aminoácidos y un residuo n-octanoico en la serina de la posición 3 del extremo N-terminal (Fig. 1), constituye el ligando endógeno para el receptor huérfano de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R) (Kojima y col., 1999). Como su nombre indica, este receptor está implicado en la secreción de GH, y, conjuntamente con ghrelin, constituye la tercera vía de regulación de la secreción de hormona de crecimiento. Hasta el momento sólo se conocían dos vías reguladoras de la secreción de GH: la vía de la hormona liberadora de GH (GHRH) y la vía de la somatostatina (SS) (Kojima y col., 1999).

Posteriormente se demostró que ghrelin no sólo actúa estimulando la liberación de GH, sino que ejerce una gran variedad de efectos, dada la amplia distribución tisular de su receptor. Ghrelin actúa regulando el apetito y el peso corporal, el eje gonadal, el metabolismo de los carbohidratos, la proliferación celular, el sueño y cabe destacar también su importante papel sobre el sistema cardiovascular (Kojima y Kangawa, 2005).

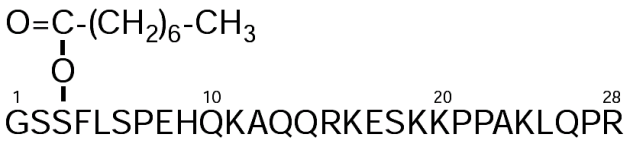


Figura 1. Representación de la estructura aminoacídica de ghrelin y la modificación octanoica en la serina de la posición 3.

Descubrimiento de ghrelin

Ghrelin fue descubierto por el grupo de los doctores Kangawa y Kojima (1999) durante la realización de estudios para analizar los efectos cardiovasculares de los GHS. Este grupo estudió el efecto de la administración de diferentes extractos celulares sobre la variación de la concentración de calcio en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa de forma estable el receptor de secretagogos de GH (CHO-GHSR62). La mayor activación, en cuanto al aumento de calcio intracelular, se produjo tras la exposición a extractos de estómago (Kojima y col., 1999).

A partir de estos extractos de estómago de rata se purificó el compuesto activo mediante el paso de la muestra por columnas de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). La denominación del compuesto bioactivo obtenido surgió como la unión de las raíces 'ghre', que es la raíz Proto-Indo-Europea de la palabra 'growth' que significa crecimiento, y 'relin' que significa liberación. En conjunto, su nombre es representativo de la primera función biológica descubierta para ghrelin, la estimulación de la secreción de GH (Kojima y col., 1999).

Estructura génica

El gen que codifica para ghrelin en humanos se localiza en el cromosoma 3, en la región 3p25-26. En rata está localizado en el cromosoma 4, región q42, y en ratón en el cromosoma 6, en la región E3.

En rata los exones 1 y 2, de los cuatro que componen el gen, son los que contienen la información codificante de la proteína madura (Kojima y col., 1999).

La composición del gen de ghrelin varía en ratón y humano. En ambos casos, el primer exón, de tan solo 19 pb en ratón y 20 pb en humano, constituye una región no codificante. Los cuatro restantes contienen la secuencia codificante de la prepro-proteína, y son los exones 2 y 3 los que contienen la información para la proteína madura (Tanaka y col., 2001; Nakai y col., 2004) (Fig. 2).

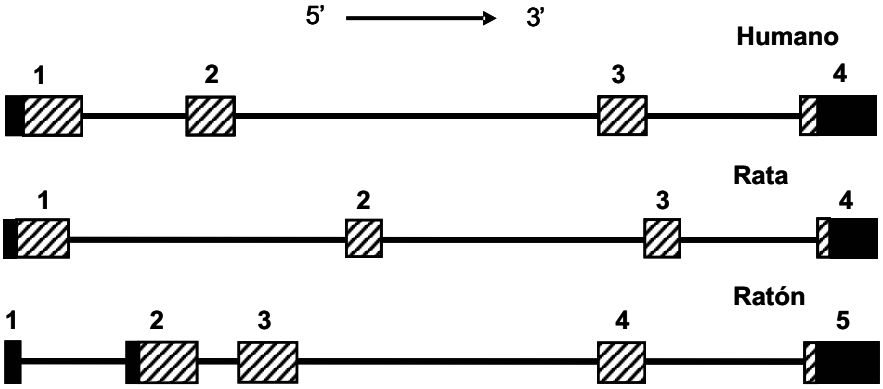


Figura 2. Representación de los genes de ghrelin correspondientes a humano, rata y ratón. Las regiones codificantes de cada gen se representan con trama de líneas en diagonal.

Se han caracterizado las regiones promotoras en humano y en rata, y ambas constan de dos lugares de iniciación de la transcripción, denominados proximal y distal, situados en la posición -32 pb y -555 pb en humanos y -30 pb y -474 pb en rata, curso arriba del codón de iniciación ATG presente en el exón 2 (Fig. 3). En ambos promotores se encontró la región mínima con actividad basal: en el caso del promotor de humanos está formada por la secuencia del exón 1 y la zona proximal del intrón 1. En rata, la región del exón 1 no es esencial para la actividad del promotor. Las regiones caja TATA se encuentran, curso arriba desde el lugar de iniciación hacia la región 5', en las posiciones -585 pb hasta la -579 pb en humanos y desde las posiciones -504 pb a -448 pb en rata (Wei y col., 2005).

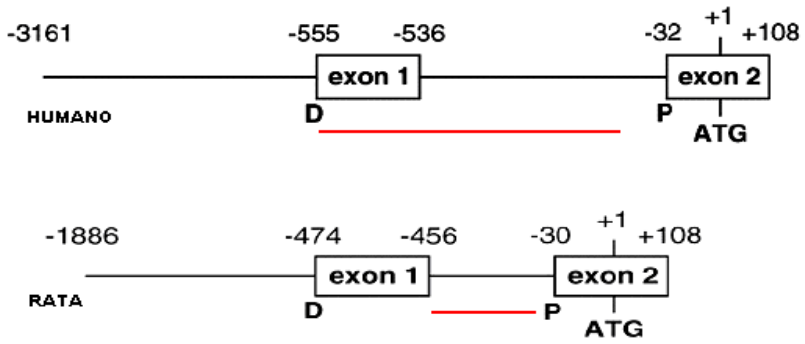


Figura 3. Representación más detallada de las regiones promotoras de los genes de ghrelin en humano y rata. En color rojo se señalan las regiones mínimas que presentan actividad basal.

La presencia de dos lugares de iniciación de la transcripción en el gen de ghrelin da origen a la formación de un transcripto de tamaño corto y otro de mayor tamaño. El transcripto de tamaño corto se expresa en todos los tejidos de rata analizados aunque varía en cuanto a sus niveles de expresión. El transcripto de mayor tamaño no se detectó en riñón, corazón, pulmón, tejido muscular o glándula suprarrenal de rata ni en las líneas celulares de cardiomiocitos de neonatos de rata (H9c2) o de células epiteliales de mucosa gástrica de rata (RGM1). Curiosamente, en las células de feocromocitoma de rata (PC12) no se detectó ninguno de los dos transcriptos (Wei y col., 2005).

En ratón, la secuencia del ADNc de ghrelin contiene 521 pb, de las cuales 44 pb componen una región 5' no codificante, 354 pb forman la región codificante para la secuencia aminoacídica de prepro-ghrelin y 123 pb que forman la región no codificante del extremo 3'. La secuencia poliadenilada está situada a 17 pb del extremo final 3', mientras que 24 pb, curso arriba, desde el lugar de iniciación hacia la región 5' se encuentra una secuencia tipo caja TATA (Tanaka y col., 2001).

La transcripción del gen de ghrelin no da como resultado una sola proteína. Este gen presenta la información genética para la expresión de ghrelin y sus variantes (Kojima y Kangawa, 2005) y además, este gen codifica también para una nueva proteína, la obestatina, que podría ser el antagonista natural de ghrelin, según los primeros análisis funcionales realizados para esta proteína (Zhang y col., 2005a).

Existen otras dos variantes de expresión del gen de ghrelin en ratón; la primera, descrita en testículo de ratón, se denomina transcripto derivado del gen de ghrelin (GGDT) y está codificada por los exones 1, 4 y 5. Se desconoce si GGDT se traduce *in vivo* debido a que carece de señal peptídica, aunque se sugiere un posible papel en la actividad reproductora (Tanaka y col., 2001). La segunda variante ocurre por la delección completa del exón 4, resultando un cambio estructural del ADNc con un codón de finalización prematuro que al transcribirse origina un péptido con una secuencia diferente en los últimos 11 aa del extremo C-terminal (Jeffery y col., 2005).

Estructura proteica

Ghrelin se sintetiza en forma de precursor como prepro-hormona de 117 aminoácidos. Los 23 primeros codifican el péptido señal, los siguientes 28 aminoácidos forman el péptido y los restantes la región C-terminal (Date y col., 2000) (Fig. 4).

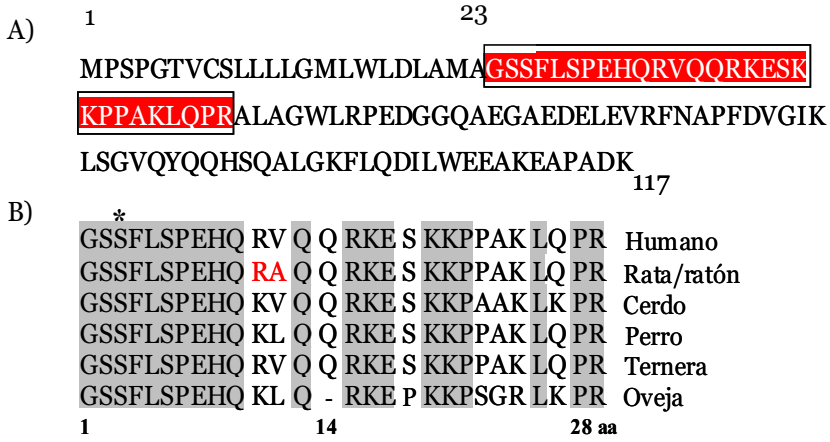


Figura 4. A) Representación de la estructura proteica de prepro-ghrelin formado por tres fragmentos de 23, 28 y 66 aa. El fragmento central de 28 aa corresponde a la secuencia madura de ghrelin. B) Comparación aminoacídica de ghrelin entre diferentes especies. En la secuencia de rata y ratón se marcan en rojo los dos únicos aa que difieren con la secuencia de humano. El asterisco marca la serina 3 donde se produce la acilación de ghrelin.

Posteriormente, la secuencia aminoacídica de prepro-ghrelin se procesa a pro-ghrelin, tras liberarse la secuencia del péptido señal, y finalmente, al liberarse la región C-terminal, como péptido de 28 aminoácidos (Kojima y col., 1999).

Ghrelin presenta una acetilación, con un residuo n-octanoico, que ocurre después de la síntesis proteica. El péptido que se produce tras la traducción sin la acetilación se denomina des-acil o des-octanoil ghrelin (Des-G) (Hosoda y col., 2000a).

Este mecanismo post-traduccional de acetilación no se ha presentado con anterioridad en ningún otro péptido natural, por lo que se desconoce el mecanismo que regula el balance entre las formas de ghrelin acilada y desacilada, así como la enzima o enzimas que regulan este proceso (Kojima y Kangawa, 2005) (Fig. 5).

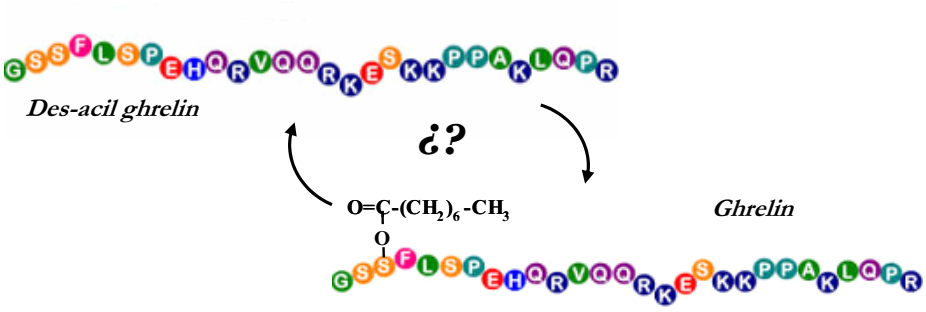


Figura 5. Balance entre la forma de ghrelin y Des-G ¿Cuál o cuales son las enzimas que regulan este proceso?

La paroxonasa fue la primera enzima propuesta. Esta esterasa calcio dependiente, presente en plasma, actúa rompiendo lípidos oxidados en LDL. La presencia en plasma de complejos proteicos formados por ghrelin, HDL y la paroxonasa, podría sugerir un papel de esta enzima en la relación o conversión Des-G y ghrelin, ya que la unión del grupo lipídico octanoil de ghrelin se realiza mediante un enlace éster (Beaumont y col., 2003). La administración de ghrelin exógeno en una solución de plasma no incrementó la concentración de Des-G, lo que indica que la enzima encargada de regular la conversión de ghrelin en Des-G no está presente en plasma (Shanado y col., 2004).

La otra enzima candidata, propuesta por el grupo de Shanado y colaboradores (2004), es la enzima lisofosfolipasa I (LysoPLA I). Está presente en estómago y puede jugar un papel regulador en el proceso del intercambio entre el estado acilado y desacilado de ghrelin, puesto que el inhibidor irreversible de la LysoPLA I, el metil araquidonil fluorofosfonato, inhibe el paso de ghrelin a Des-G (Shanado y col., 2004).

Aislamiento y caracterización

Desde un primer momento la modificación octanoica que presenta ghrelin se propuso como la característica esencial para su actividad biológica. La comparación funcional de ghrelin y el péptido sintético desacilado demostró que éste último no aumenta la concentración de calcio intracelular en células que expresan GHS-R, y sus características de tiempo de retención en el proceso de RP-HPLC y peso molecular son diferentes a las del péptido acilado (Kojima y col., 1999) (Fig. 6).

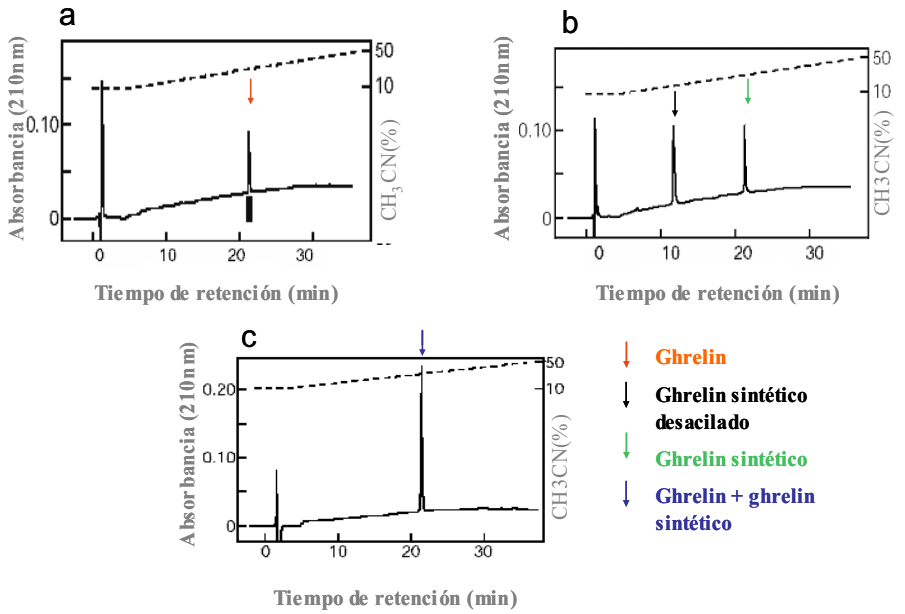


Figura 6. Representación del proceso de RT-HPLC analizando las características de retención de ghrelin. a) Representación del péptido ghrelin, cuyo tiempo de retención es de alrededor de 20 minutos. b) Representación de los tiempos de retención de ghrelin sintético acilado y de la forma desacilada de ghrelin, también sintética, que presenta un tiempo de retención menor (≈10 minutos), como se puede apreciar por la presencia de los dos picos de elución. c) Representación de las características de elución de ghrelin y de ghrelin sintético, ambas formas aciladas, que muestran el mismo tiempo de retención, por lo que aparece un solo pico poco después de los 20 minutos.

Se realizaron varios estudios para averiguar cuál podría ser la sustancia, hasta entonces desconocida, que conformaba la modificación presente en ghrelin. Se especuló acerca de la posibilidad de que fuese un metal, un carbohidrato o un lípido. Finalmente se comprobó que la unión de un componente de origen lipídico, un ácido graso de cadena mediana (el ácido n-octanoico), al grupo hidroxilo de la serina 3 del compuesto sintético, resultaba en la formación de un compuesto de idénticas características cromatográficas, estructurales y de bioactividad que ghrelin purificado (Fig. 7). Se demostró así la configuración total de ghrelin (Kojima y col,. 1999), que curiosamente no tiene ninguna homología estructural con los secretagogos peptídicos capaces de unirse al GHS-R.

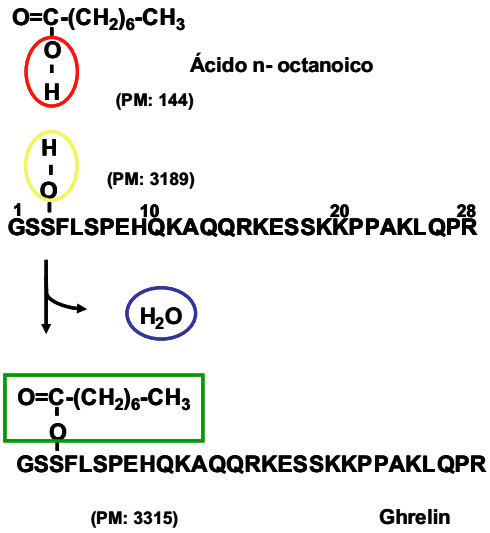


Figura 7. Síntesis de ghrelin. Se produce una esterificación del grupo hidroxilo presente en la serina de la posición 3 con el ácido n-octanoico formando un compuesto de idénticas características al compuesto endógeno.

Conjuntamente con el descubrimiento de ghrelin, el análisis por RT-HPLC de los extractos celulares de estómago de rata demostró la existencia de otro compuesto que presentaba un tiempo de retención menor en la columna de cromatografía (Fig. 8). Las características de retención de este compuesto eran idénticas a las del compuesto sintético desacilado. Tras las posteriores purificaciones se observó que este compuesto se correspondía con la forma desacilada de ghrelin, Des-G (Hosoda y col., 2000a).

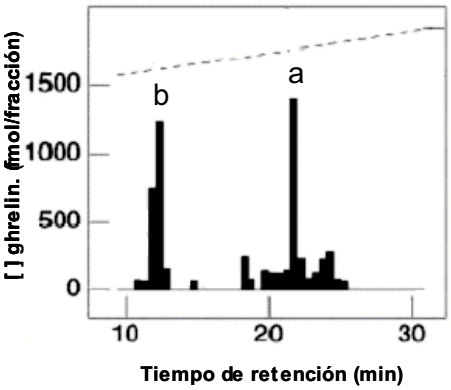


Figura 8. Representación del proceso de RT-HPLC analizando las características de retención de los péptidos endógenos ghrelin y Des-G. Ghrelin presenta un tiempo de retención de unos 20 minutos aproximadamente (pico a). El tiempo de la forma Des-G es menor, alrededor de 10 minutos (pico b).

Des-G no tiene capacidad de movilizar el calcio intracelular, lo que hacía pensar que la forma activa del péptido era solamente la acilada (Hosoda y col., 2000a). Recientemente este concepto ha cambiado, y como veremos con detalle más adelante, se ha demostrado que Des-G es bioactivo sobre músculo papilar (Bedendi y col., 2003), adipocitos (Muccioli y col., 2004), células de cáncer de próstata (Cassoni y col., 2004), o hepatocitos (Gauna y col., 2005). Además regula el metabolismo de la glucosa e insulina (Broglio y col., 2004), la ingesta y la motilidad gástrica (Asakawa y col., 2005).

Posteriormente, se demostró la existencia de otro ligando endógeno, a parte del ya mencionado Des-G, para el receptor de secretagogos de GH. Se denomina Des-Gln14-ghrelin, debido a que esta forma carece de la glutamina de la posición 14. Esta variante de ghrelin, de 27 aa, representa solamente un 10 % del ghrelin total en estómago. Al analizar la secuencia del gen de ghrelin, se encontró la presencia de un intrón entre la región codificante para las glutaminas de las posiciones 13 y 14. Este intrón presenta en su extremo terminal 3' la secuencia nucelotídica "CAGCAG", donde las secuencias AG actúan como señal de "splicing". Si en la secuencia del intrón se utiliza el primer AG como señal de maduración, el resultado es la síntesis de prepro-ghrelin, y el segundo AG se traduce dentro del triplete CAG como glutamina (en la posición 14). En cambio si la señal de "splicing" es el segundo AG, se produce un prepro-ghrelin carente de un aminoácido, dando como producto Des-Gln14-ghrelin (Hosoda y col., 2000b).

Des-Gln14-ghrelin contiene igualmente la modificación n-octanoica en la serina 3, y, cuando se administra en ratas, estimula la secreción de GH al igual que ghrelin (Hosoda y col., 2000b).

Existen otras isoformas descritas en humano, que varían con respecto a ghrelin en cuanto a la longitud de la secuencia peptídica o en el tamaño del compuesto acilado presente en la serina (Hosoda y col., 2003) (Tabla 1).

Un proceso proteolítico es el causante de las isoformas de ghrelin o de sus variantes (Des-G o Des-Gln14-ghrelin) compuestas por 27 aa, puesto que los residuos básicos de la Pro27 y Arg28 del extremo C-terminal sirven como señal de corte para convertasas de pro-hormonas (Hosoda y col., 2003).

Nombre	Longitud
Ghrelin (Octanoil)	**1-28 aa.**
Des-acil ghrelin (Des-octanoil)	**1-28 aa.**
Des-acil ghrelin (Des-octanoil)	**1-27 aa.**
Des-Gln14-ghrelin (Octanoil)	**1-27 aa.**
Octanoil ghrelin	**1-27 aa.**
Decanoil ghrelin	**1-28 aa.**
Decanoil ghrelin	**1-27 aa.**
Decenoil ghrelin	**1-28 aa.**

Tabla 1. Diversas variantes de ghrelin y su nomenclatura.

En el año 2003, Pemberton y colaboradores detectan la existencia de un fragmento formado por 32 aa de la región C-terminal de pro-ghrelin, denominado C-ghrelin, en el torrente circulatorio. Se desconoce su implicación funcional pero sus niveles varían en patologías cardíacas, por lo que podría tener algún papel a nivel cardiovascular (Pemberton y col., 2003) (Fig. 9).

La obestatina, descubierta recientemente, se produce también a partir de la secuencia de ghrelin, más concretamente de la región C-terminal de prepro-ghrelin (Fig. 9). Está compuesta por 23 aminoácidos, y presenta en su región C-terminal un grupo amida como modificación post-traduccional (Zhang y col., 2005a). En los estudios preliminares realizados con la obestatina, se ha determinado que la forma activa de la proteína es la forma amidada, y funcionalmente parece presentar acciones opuestas a las de ghrelin (Zhang y col., 2005a) (Fig. 9).

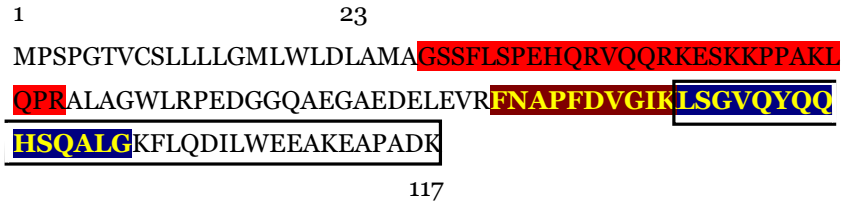


Figura 9. Representación de prepro-ghrelin y los péptidos que se generan a partir de esta secuencia aminoacídica. En rojo la secuencia que da origen a ghrelin, Des-G, Des-Q-14, y otras variantes. La secuencia recuadrada representa la secuencia de aa del C-ghrelin. La secuencia aa en amarillo se corresponde con la secuencia consenso de la composición de obestatina. C-ghrelin y la obestatina comparten secuencia de aa, representada en color azul.

Al igual que para ghrelin, se desconocen las enzimas o mecanismos que provocan la formación del C-ghrelin o la formación y modificación post-transduccional de la obestatina. Además al compartir estos dos péptidos parte de la secuencia aminoacídica ¿cuál sería el mecanismo que regula la formación de uno u otro?

La presencia de ghrelin en mamíferos y no mamíferos demuestra que está altamente conservado. Así, la semejanza entre la secuencia aminoacídica de prepro-ghrelin de rata o ratón con la secuencia humana es de 82,9% (Kojima y col., 1999) (Fig. 10), y en humano la secuencia aminoacídica de ghrelin, compuesta por los 28 aa, es homóloga a la de rata y ratón exceptuando dos cambios aminoacídicos (Date y col., 2000).

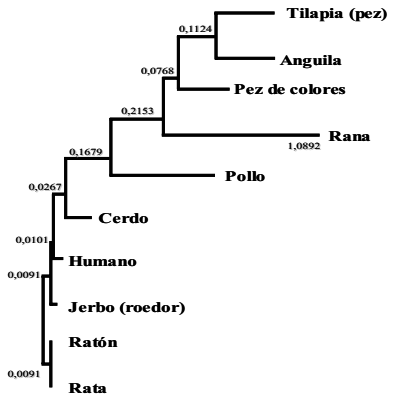


Figura 10. Estudio filogenético (análisis Neighbor-Joining) en el que se muestra la gran homología entre la secuencia de ghrelin entre especies. La mayor homología está entre roedores y humanos. Las diferencias se marcan a la izquierda de cada rama (Parhar y col., 2003).

Los siete primeros residuos aminoacídicos y la modificación n-octanoica también están altamente conservados entre especies, como se podría suponer debido a su característica de "centro activo" (Date y col., 2000). Aunque estudios posteriores han demostrado que modificaciones realizadas en la región de acilación de ghrelin que se podría suponer inalterable para el mantenimiento de su funcionalidad, no provocan pérdida de actividad. Si se realiza una modificación en la acilación de la serina 3 con cadenas alifáticas largas o grupos octanoil insaturados, ghrelin no pierde su actividad, pero si el cambio se realiza con grupos menos hidrofóbicos, la actividad de ghrelin disminuye drásticamente. Incluso la transferencia de la acilación desde la serina de la posición 3 a la serina de la posición 2 no provoca una reducción en cuanto a la actividad de ghrelin (Korbonits y col., 2004).

Otros estudios con pequeños péptidos, simplemente compuestos por los primeros cuatro o cinco residuos de la estructura de ghrelin, indican que el segmento N-terminal "Gly-Ser-Ser(n-octanoyl)-Phe" constituye el 'centro activo' requerido para una unión eficiente y posterior activación del receptor (Bednarek y col., 2000); debido a que estos pequeños fragmentos son capaces de activar *in vitro* de manera eficaz GHS-R como si se tratase de la secuencia completa (Inui, 2001). Al no ocurrir lo mismo en sistemas *in vivo* se deduce que el extremo C-terminal también juega un importante papel en la actividad de ghrelin (Torsello y col., 2002).

Distribución tisular

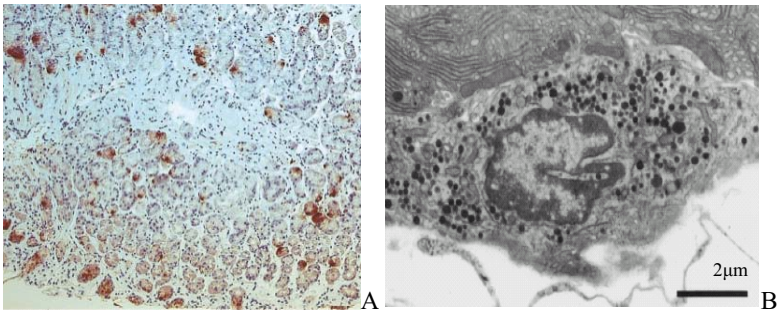
Tanto ghrelin como sus variantes (Des-G, Des-Gln14-ghrelin, etc.) se sintetizan principalmente en estómago, en células neuroendocrinas del fundus gástrico, y posteriormente se secretan al torrente circulatorio (Date y col., 2000; Hosoda y col., 2000b). Tanto en estómago como en plasma la proporción de Des-G es mayor que la de ghrelin (2:1) (Hosoda y col., 2000a; Yoshimoto y col., 2002).

La importancia del aporte de ghrelin por parte del estómago se puso de manifiesto en individuos sometidos a gastrectomía, cuyos niveles plasmáticos de ghrelin se reducen entre un 65% y un 85% del total (Ariyasu y col., 2001; Djurhuus y col., 2002).

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, microscopía electrónica e hibridación *in situ,* se determinó cuáles eran las células productoras de ghrelin (Date y col., 2000): en humanos se denominan células P/D1 y en roedores células tipo X/A. Éstas almacenan ghrelin en el citoplasma celular en gránulos electrón-densos, compactos y redondeados de un tamaño aproximado de 140nm y 180nm respectivamente (Toshinai y col., 2001; Rindi y col., 2002) (Fig. 11).

De las cuatro poblaciones de células endocrinas en la glándula oxíntica, la población mayoritaria es la formada por células tipo enterocromafina (células ECL), productoras de histamina, con un 60-70% del total en rata y un 30% en humano. Las células productoras de ghrelin conforman entre un 20% y un 30% del total de la población de células endocrinas de la glándula oxíntica, siendo la segunda población más frecuente tras las células ECL (Toshinai y col., 2001) y mayor población con respecto a los otros tipos celulares existentes: células D, productoras de histamina con 2-5% de porcentaje en rata y un 22% en humano y las células enterocromafina (células

EC), productoras de serotonina, en mucha menor proporción (0-2% en rata y 7% en humano) (Simonsson y col., 1988).



A B

Figura 11. Microfotografías de inmunohistoquímica y microscopía electrónica para ghrelin. A) Células de estómago humano inmunoreactivas a ghrelin (100x) B) Célula de la glándula oxíntica de estómago de rata. Mediante microscopía electrónica se pueden ver los múltiples gránulos electrón-densos de forma redondeada y compacta presentes en el citoplasma celular (Date y col., 2000; Korbonits y col., 2001).

Dentro de las células productoras de péptidos gástricos cabe destacar que sólo las células que expresan ghrelin presentan una gran conexión con la lámina media y red vascular (Jarkovska y col., 2004), ya que ghrelin y Des-G, a pesar de ser péptidos gástricos, no se secretan al tracto digestivo sino al torrente sanguíneo (Hosoda y col., 2000a).

Patologías como la diabetes u obesidad presentan una reducción en el número de células X/A productoras de ghrelin en estómago y duodeno, en comparación con individuos control (Rauma y col., 2006).

Aunque el estómago es el principal productor de ghrelin, también se ha encontrado, en menor grado, expresión de ghrelin en una gran cantidad de tejidos mediante el uso de diferentes técnicas de análisis como son: radioinmunoensayo, hibridación *in situ*, RT-PCR o inmunohistoquímica. Se ha encontrado ghrelin en los núcleos hipotalámicos arcuato (ARC), paraventricular, ventromedial y dorsomedial (Cowley y col., 2003), en hipófisis (Korbonits y col., 2001), en intestino (Date y col., 2000), en riñón (Mori y col., 2000) y en placenta (Gualillo y col., 2001). Mediante la técnica de PCR en tiempo real se ha visto que otros muchos tejidos como el páncreas, el ovario, la próstata o el tejido adiposo, también expresan ghrelin (Gnanapanvan y col., 2002).

El número de células X/A productoras de ghrelin aumenta con el desarrollo. Ghrelin se expresa a niveles bajos en estómago fetal, y su expresión va aumentando con posterioridad al nacimiento (Hayashida y col., 2002). De forma compensatoria, el páncreas en estas etapas es el principal aporte de ghrelin al torrente circulatorio. En adultos, por el contrario, es el estómago el principal productor de ghrelin (Chanoine y Wong, 2004), seguido por el intestino (Kojima y col., 1999). El mecanismo o motivo por el cual se produce un cambio en cuanto al tejido productor de ghrelin se desconoce. Se sugiere que las células productoras de ghrelin e insulina derivan de un mismo precursor y sufren un proceso de especialización. En etapas tempranas se activarían los genes para la expresión de ghrelin e inhibirían los de la insulina (Prado y col., 2004), posteriormente, durante el desarrollo, este proceso se invierte y estas células expresan los genes necesarios para la producción de insulina por parte del páncreas.

Esta hipótesis surge porque el estudio de las células productoras de ghrelin en páncreas ha sido y es uno de los puntos que genera mayor controversia en los últimos años. Existen tres hipótesis en cuanto al origen celular de ghrelin en páncreas; dos de ellas sugieren que ghrelin se expresa o bien en los islotes de células productoras de glucagón; células α (Date y col., 2002a) o en los islotes de células productoras de insulina; células β (Volante y col., 2002). La tercera afirma la existencia de una nueva población de células, distinta a las anteriores, correspondiente a las células productoras de ghrelin, denominadas células ε (Prado y col., 2004; Wierup y Sundler, 2005) (Fig. 12).

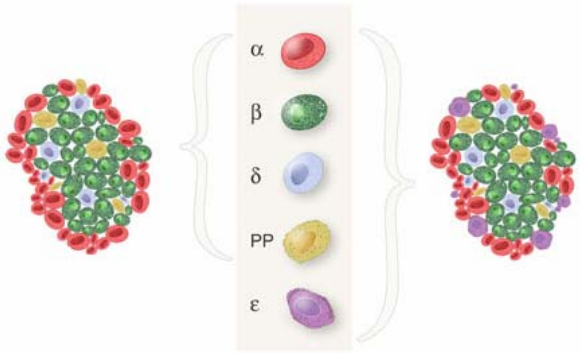


Figura 12. Esquema que representa en la parte izquierda el concepto tradicional de la composición de los islotes de Langerhans del páncreas (4 poblaciones de células: α, producen glucagón, β, expresan insulina, δ, secretan somatostatina y PP, producen polipéptido pancreático) y en la parte derecha el concepto actual que postula la existencia de una nueva población de células denominadas células ε, que son las células productoras de ghrelin.

Secretagogos de GH (GHS)

Los GHS son pequeños fármacos o pépticos sintéticos capaces de activar el eje GH-IGF-I tras su administración vía intravenosa, subcutánea, nasal u oral (Anderson y col., 2005). Se desarrollaron como alternativa al tratamiento con las hormonas recombinantes humanas GH y GHRH (hormona liberadora de GH) (Carpino, 1999), con el objetivo de reestablecer los perfiles normales de pulsatilidad de la GH en ancianos (Smith y col., 1997).

Los GHS presentan gran similitud en cuanto a su estructura tridimensional, aunque no en cuanto a su bioactividad o vida media. Así, los GHS peptídicos son compuestos de baja bioactividad y corta vida en comparación con los no peptídicos, que son menos susceptibles a la degradación (Smith y col., 1997; Smith, 2005).

Monany y colaboradores (1981) describieron la síntesis de una clase de pequeños péptidos basados en la estructura Met- y Leu- encefalinas. Desarrollaron el hexapéptido sintético, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH_2, denominado GHRP-6, capaz de estimular la liberación de GH *in vivo* e *in vitro*. En un primer momento, su pequeño tamaño y actividad, lo propuso como un buen candidato para el tratamiento clínico, pero como inconveniente presenta una pobre bioviabilidad oral y corta vida media *in vivo* (Smith, 2005). Existen otros derivados del GHRP-6: el GHRP-1, GHRP-2 o la hexarelina (Fig. 13), todos ellos actúan de forma sinérgica con la GHRH, en la liberación de GH *in vivo* y de forma adictiva *in vitro*, a través del GHS-R (Howard y col., 1996). La hexarelina modifica su estructura con respecto al GHRP-6 tras la metilación del triptófano de la posición 2 (Ghigo y col., 1994), y además, de su actividad sobre la secreción de GH, presenta un papel importante en el sistema cardiovascular (Cao y col., 2006). Incluso antes del descubrimiento de ghrelin, se demostró que la hexarelina presenta un efecto beneficioso frente al daño producido en isquemia y repercusión (Rossoni y col., 1998). Muchos de los estudios realizados posteriormente demuestran que la hexarelina y ghrelin comparten actividades a nivel cardiovascular (Locatelli y col., 1999; Pettersson y col., 2002; Frascarelli y col., 2003).

Dentro de los secretagogos no peptídicos, el MK-0677 (L-163,191) es el más potente, y presenta una viabilidad oral y en plasma mayor que el GHRP-6 (Smith y col., 1996). Éste fue el secretagogo empleado en los estudios llevados a cabo en el año 1996

para la identificación y clonación del receptor huérfano de secretagogos de GH (Pong y col., 1996). A partir de su estructura se han desarrollado otros muchos secretagogos no peptídicos (Smith, 2005), algunos de los cuales se citan en la figura 13. Su principal actividad es promover la secreción de GH (Smith y col., 1996), aunque también se ha visto que actúa, en menor grado que ghrelin, sobre la reducción de la lipólisis en adipocitos (Muccioli y col., 2004).

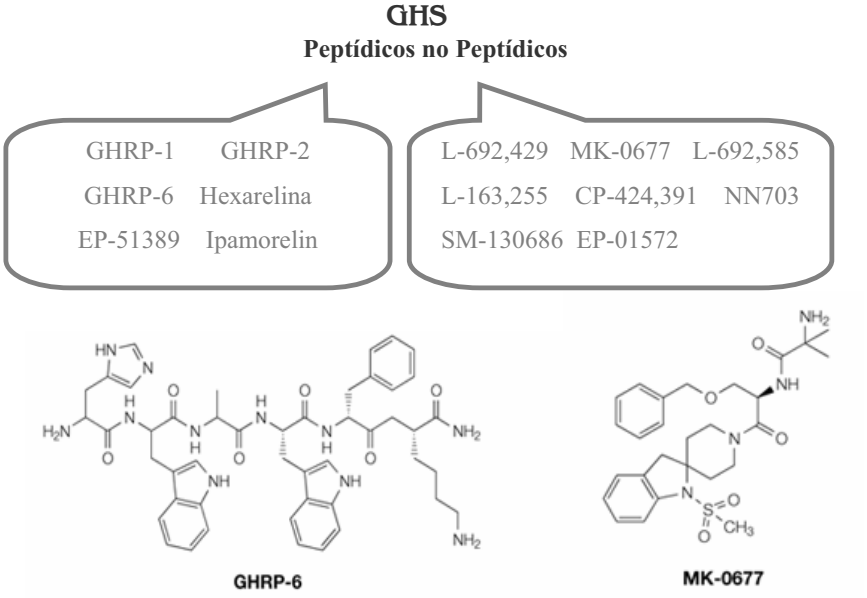


Figura 13. Relación de GHS peptídicos y no peptídicos y estructura química del GHRP-6 y MK-0667. Como se puede observar ambos secretagogos no presentan ninguna homología estructural con ghrelin a pesar de ser capaces de unirse al mismo receptor, GHS-R.

La unión de los GHS al receptor de secretagogos de GH en una célula somatotropa provoca la activación de la ruta de señalización intracelular en la que interviene en primer término la proteína fosfolipasa C, que genera el incremento intracelular de inositol fosfato y diacilglicerol a partir del fosfoinositol trifosfato, PIP_3. El diacilglicerol actúa como segundo mensajero para la activación del enzima proteína quinasa C y la entrada de calcio al interior de la célula, mientras que el inositol fosfato desencadena la salida del calcio de los depósitos intracelulares (Chen y col., 1996). Se produce también, como consecuencia de la unión ligando receptor, una inhibición de los canales de potasio, permitiendo la entrada de calcio a través de canales de voltaje tipo L y tipo T. En conjunto, el aumento de la concentración de calcio intracelular estimula la liberación

de GH (Inui., 2001) (Fig. 14).

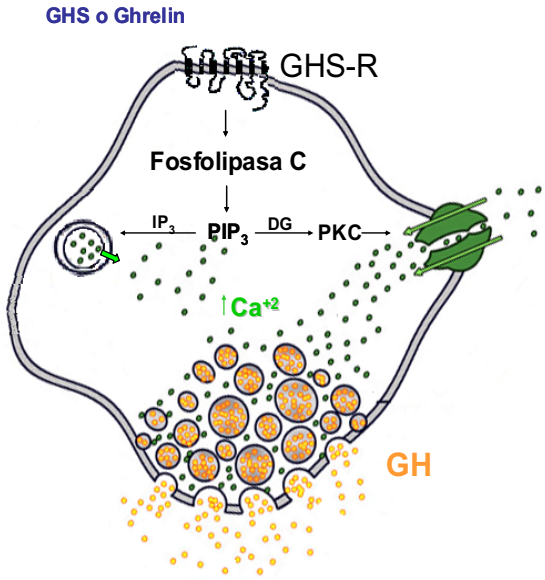


Figura 14. Ruta metabólica de ghrelin implicada en la liberación de la hormona de crecimiento en una célula somatoropa. En esta ruta ghrelin se une a su receptor (GHS-R) e incrementa los niveles de calcio intracelular a través de la ruta metabólica de fosfoinositol-3-fostato (PIP_3).

Receptor de secretagogos de GH

La familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) incluye al receptor de secretagogos de GH (GHS-R), el receptor de la motilina (GPR38), neurotensina, neuromedina U, y el receptor de la obestatina (GPR39) hasta hace muy poco considerado como un receptor huérfano (Holst y col., 2004; Zhang y col., 2005a) (Fig. 15).

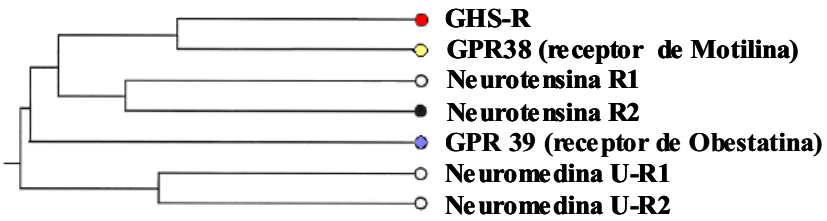


Figura 15. Árbol filogenético en donde se representa el grado de homología de los receptores acoplados a proteínas G.

El receptor de secretagogos de GH fue identificado en el año 1996 y, hasta su descubrimiento, se consideró un receptor huérfano formado por siete dominios transmembrana (Howard y col., 1996) (Fig. 16).

El gen que codifica para el GHS-R en humanos y ratón se localiza en el cromosoma 3, en las regiones q26.2 y A3, respectivamente. En rata el gen se localiza en el cromosoma 2, región 2q24. Su estructura génica, compuesta por 2 exones y un intrón de aproximadamente 2kb, está altamente conservada entre especies, presentando una homología del 96% entre el receptor de rata/ratón y de humanos. El exón 1 presenta la información genética para las cinco primeras regiones transmembrana y el exón 2 para las TM 6 y 7; ambos codifican para una proteína 41kDa (366 aa) que constituye el receptor funcional. (McKee y col., 1997).

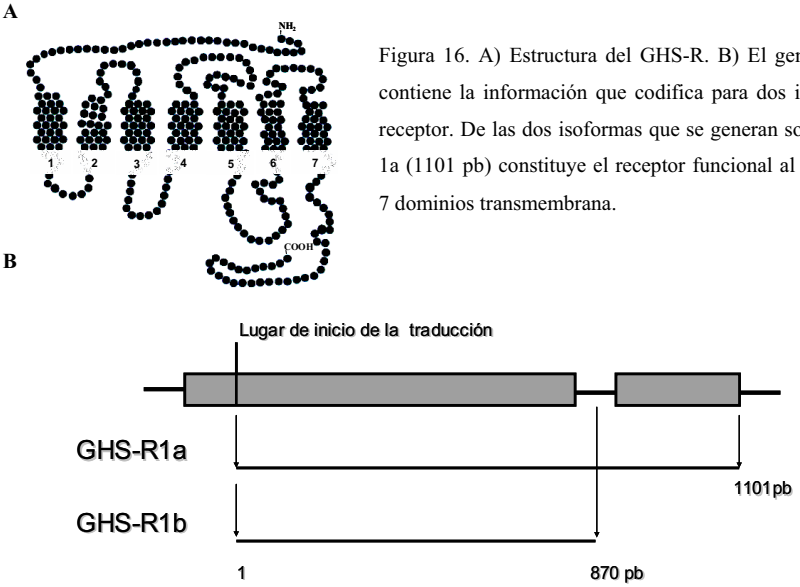


Figura 16. A) Estructura del GHS-R. B) El gen del GHS-R contiene la información que codifica para dos isoformas del receptor. De las dos isoformas que se generan solo la GHS-R 1a (1101 pb) constituye el receptor funcional al presentar los 7 dominios transmembrana.

Existen dos variantes de este receptor, que actualmente se denominan forma 1a (GHS-R1a) y forma 1b (GHS-R1b). El GHS-R1a es el receptor capaz de generar una respuesta intracelular a través de la subunidad Gα11 (McKee y col., 1997). Además, presenta características típicas de un GPCR como son la existencia de: a) residuos cisteína conservados en los dos primeros lazos extracelulares, b) potenciales sitios de modificaciones post-transduccionales (N-glicosilación o fosforilación) y c) una secuencia triplete aromática (E/DRY) localizada inmediatamente después del dominio transmembrana 3 en el segundo lazo intracelular (Kojima y Kangawa., 2005).

La otra variante, denominada forma 1b (GHS-R1b), carece de las dos últimas regiones transmembrana, y hasta el día de hoy no se ha demostrado su participación en mecanismos de transducción de señal hormonal (Howard y col., 1996). Estas dos isoformas se diferencian en la región del extremo C-terminal, y se producen por un proceso de maduración por "splicing" alternativo, generándose para el GHS-R1a una proteína de 366 aa y para el GHS-R1b una de 289 aa (McKee y col., 1997) (Fig.16).

La forma GHS-R1a se expresa principalmente en hipófisis e hipotálamo (preferentemente en el núcleo arcuato (ARC) y ventromedial (VMN)) (Bennett y col., 1997). En menor grado en la glándula de tiroides, páncreas, pulmón, glándula adrenal, ovario y testículo (Gaytan y col., 2003; Gaytan y col., 2004), miocardio (Gnanapavan y col., 2002) y aorta (Nagaya y col., 2001a).

La forma GHS-R1b, presenta una amplia distribución tisular en humanos, aunque se desconoce la razón de su ubicuidad (Gnanapavan y col., 2002).

El receptor GHS-R1a tiene un importante mecanismo de regulación de la respuesta hormonal. La unión de ghrelin al receptor GHS-R1a conlleva la internalización del receptor de superficie hacia compartimentos intracelulares. Esta internalización se correlaciona positivamente con el tiempo de exposición a ghrelin, siendo máxima la respuesta a los 20 minutos. Aproximadamente 6 horas después de la eliminación del estímulo el total de los receptores vuelven a la membrana recuperando su capacidad de unión y funcionalidad (Camiña, 2006).

La expresión del receptor de secretatogos de GH en hipófisis está regulada por factores como la edad, los niveles de hormona liberadora de GH (GHRH) (Kamegai y col., 1999), los niveles de hormonas tiroideas (Kamegai y col., 2001a), glucocorticoides (Tamura y col., 2000; Petersenn y col., 2001), estrógenos (Petersenn y col., 2001) o GH (Bennett y col., 1997). El sexo también influye, siendo mayor la expresión de GHS-R en hipófisis de ratas hembras que en machos (Kamegai y col., 1999). Esta regulación por el sexo sobre el GHS-R no ocurre en hipotálamo, en el que, sin embargo, los niveles de expresión sí están regulados por la edad (Kamegai y col., 1999).

Desde el año 2000 se ha postulado la existencia de uno o varios receptores de ghrelin distintos al receptor clásico GHS-R. Cassoni y colaboradores (2001) encontraron que tres líneas celulares humanas de cáncer de mama (MCF7, T47D y MDA-MB231) no expresan ARN mensajero del receptor clásico GHS-R1a, y demuestran que tanto ghrelin como Des-G o los GHS utilizados en el estudio causan una reducción de la proliferación celular de estas líneas tumorales (Cassoni y col., 2001). Por otro lado, en la línea cardiomiocitaria H9c2, la administración de ghrelin o Des-G provocan un efecto cardioprotector activando rutas de señalización intracelulares anti-apoptóticas, a pesar de que estas células no expresan GHS-R1a (Baldanzi y col., 2002). Finalmente, ghrelin inhibe la adipogénesis (Zhang y col., 2004b), y estimula la proliferación (Zhang y col., 2004a; Kim y col., 2004) y diferenciación celular (Kim y col., 2004) en la línea celular 3T3-L1 de pre-adipocitos y adipocitos de ratón. No obstante no está claro si es el GHS-R el receptor implicado en las acciones de ghrelin sobre este tipo celular, puesto que la expresión del receptor ha sido descrita solamente en uno de estos trabajos (Kim y col., 2004).

La existencia de estos estudios, que describen acciones tanto de ghrelin como de Des-G en diversos tipos celulares, en alguno de los cuales no existe expresión del receptor GHS-R1a, sugieren la presencia de uno o varios receptores, distintos al GHS-R1a, capaces de modular la señal generada tras la unión de ghrelin o Des-G (Cassoni y col., 2004; Baldanzi y col., 2002; Zhang y col., 2004b). Esta hipótesis se apoya además en el hecho de que a pesar de que Des-G no es capaz de unirse al GHS-R1a (Kojima y col., 1999), este péptido tiene actividad biológica (Bedendi y col., 2003; Cassoni y col., 2004; Asakawa y col., 2005).

Aparte del receptor de ghrelin, cabe destacar dos receptores de esta familia: el receptor de la motilina (GPR38) y el receptor para la obestatina (GPR39).

La motilina es una hormona que se expresa en el tracto gastrointestinal, donde actúa de forma local a través de su receptor; GPR38. Al presentar este receptor alta homología con el GHS-R, y la motilina con ghrelin, además de ejercer efectos similares, se sugirió en un primer momento que ghrelin y la motilina fuesen la misma proteína (Tomasetto y col., 2001). A pesar de su homología, sin embargo, estos receptores presentan una característica que los diferencia claramente: el receptor de la motilina se activa tras la unión de su ligando, mientras que el GHS-R puede estar activo de forma

constitutiva (Holst y col., 2004).

El receptor GPR39, huérfano hasta el pasado año, es el receptor para la obestatina (Zhang y col., 2005a). Presenta también una alta homología con el receptor de ghrelin, y dada su anterior característica de receptor huérfano (Holst y col., 2004) y la búsqueda de un nuevo receptor para ghrelin y/o Des-G (Pettersson y col., 2002; Baldanzi y col., 2002; Cassoni y col., 2004; Kim y col., 2004), se especuló la posible capacidad de unión de ghrelin al mismo. Sin embargo los estudios de unión ligando-receptor con GPR39 y ^{125}I-obestatina, demuestran que ghrelin no es capaz de desplazar la unión específica de la obestatina, por lo que el GPR39 no parece ser un receptor diana para ghrelin (Zhang y col., 2005a).

En resumen, aunque se asume que el receptor GHS-R es el encargado de mediar la mayor parte de las acciones endocrinas de ghrelin, hoy en día se hipotetiza la existencia de un nuevo receptor, aún por caracterizar, que posiblemente regularía las funciones no endocrinas de ghrelin y las de Des-G. Quedaría además por determinar qué mecanismos regulan la presencia de uno u ambos tipos de receptores en un determinado tipo celular.

Funciones Biológicas de Ghrelin

Regulación de la secreción de GH

Hasta el descubrimiento de ghrelin se sabía que la secreción de GH se regulaba de forma endógena por dos péptidos: la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) y la somatostatina (SS). La GHRH es secretada por neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo y actúa sobre sus receptores en hipófisis, lo que genera la activación de la adenilato ciclasa (AC) y un incremento del AMPc intracelular que activa la proteina quinasa A (PKA) y el aumento de la entrada de calcio desencadenando la liberación de GH (Fig. 17).

Por su parte la somatostatina, originada también en el hipotálamo, actúa inhibiendo neuronas productoras de GHRH a través de dos mecanismos: el primero activando sus receptores tipo 2 y 5, y el segundo hiperpolarizando las células somatotropas de la hipófisis, lo que provoca en conjunto que no se libere GH (Inui, 2001).

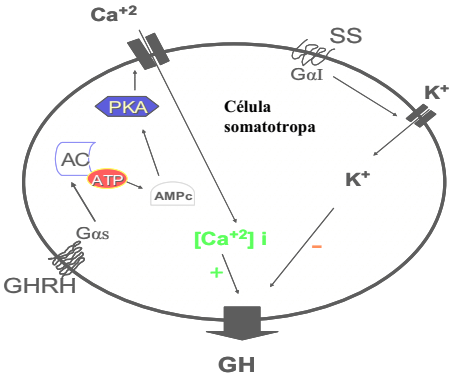


Figura 17. Vías clásicas reguladoras de la secreción de GH. La vía de la GHRH estimula la secreción de GH y la SS la inhibe.

Ghrelin se diferencia de estos dos péptidos en primer lugar por su origen gástrico. Tras su síntesis, se secreta al torrente sanguíneo donde circula hasta cruzar la barrera hemato-encefálica (BHE) y posteriormente ejercer su función en la hipófisis estimulando la secreción de GH a través del GHS-R1a (Kojima y col., 1999).

Tanto ghrelin como Des-G, presentes en el plasma sanguíneo, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica pero sus características de transporte son diferentes. Los análisis realizados en ratones mostraron que tanto el ghrelin de origen murino como el humano cruzan la BHE a través de un sistema de transporte saturable en ambas direcciones (Banks y col., 2002). Una sola molécula es capaz de activar este mecanismo. Por el contrario, Des-G atraviesa la BHE mediante transporte pasivo, no saturable, por lo que una vez dentro del sistema nervioso el cerebro lo retiene (Banks y col., 2002).

Ghrelin activa la secreción de GH de forma comparable a como lo hace GHRH tras el tratamiento *in vitro* de células de hipófisis de rata. Ejerce un efecto dosis dependiente sin alterar los valores de otras hormonas hipofisarias como la hormona adrenocorticotropina (ACTH) o la hormona foliculoestimulante (FSH) (Kojima y col., 1999). No ocurre así tras su administración *in vivo* de forma intravenosa, en la que ghrelin estimula con mayor potencia que GHRH la secreción de GH, modificando rápidamente sus niveles hasta un pico máximo a los 5-15 minutos en rata y 15-20 minutos en humanos (Kojima y col., 1999). Además, altera los niveles de ACTH, prolactina y cortisol (Takaya y col., 2000). En humanos se ha determinado también que la co-administración de GHRH y ghrelin presenta un efecto sinérgico sobre la secreción de GH (Hataya y col., 2001).

Las dosis mínimas de acción de ghrelin sobre la liberación de GH han sido determinadas en rata y humanos. En rata, la administración de 1.5 nmol o 10 pmol, según sea intavenosa (*i.v.*) o intracerebroventricular (*i.c.v.*), respectivamente, provoca un efecto potente sobre la secreción de GH. En el caso de humanos se ha determinado una dosis mínima de activación de 0.2 mg/kg tras administración *i.v.* en individuos sanos (Date y col., 2002b).

Aparentemente, la regulación de la secreción de GH provocada por ghrelin es diferente según la edad del individuo. Con el aumento de la edad se produce una reducción en los niveles circulantes de GH (Toogood y Shalet, 1998), posiblemente esto se podría explicar por una disminución en la sensibilidad de los receptores hipotalámicos o una alteración en la secreción de ghrelin (Englander y col., 2004). Actualmente se ha demostrado que no existe alteración de los niveles de ghrelin, ya que análisis realizados en animales de experimentación adultos (rata y mono) muestran niveles altos de expresión y secreción de ghrelin en comparación con los mismos sujetos de menor edad. De igual forma, la administración exógena de ghrelin en individuos adultos estimula de forma más pronunciada la secreción de GH que en individuos jóvenes (Englander y col., 2004).

Además de la actividad directa de ghrelin a nivel del hipotálamo, para estimular la secreción de GH, parece existir una conexión entre ghrelin y el nervio vago que regula la actividad de éste cuando se administra de forma *i.v.* Cuando los terminales del nervio vago, que llegan a la mucosa gastrointestinal, están inactivados, el efecto producido por ghrelin administrado periféricamente se ve claramente reducido (Date y col., 2002b).

Paradójicamente, a pesar de que Des-G es capaz de atravesar la BHE (Banks y col., 2002), o de que se expresa en el hipotálamo (Sato y col., 2005), no activa la ruta de señalización del GHS-R1a (Bednarek y col., 2001). Tampoco desplaza a ^{125}I-ghrelin en estudios *in vitro* con células de origen hipotalamo-hipofisario (Muccioli y col., 2001; Torsello y col., 2002) ni estimula *in vivo* la secreción de GH (Torsello y col., 2002). Esto indica que las acciones de Des-G, a nivel del hipotálamo, no incluyen la regulación de la secreción de GH (Torsello y col., 2002), sino otro tipo de funciones (Asakawa y col., 2005, Chen y col., 2005, Toshinai y col., 2006), que posteriormente se trataran en otro apartado con más detalle.

Regulación de la movilidad y secreción gástrica

En ratas anestesiadas la administración *i.c.v.* o *i.v.* de ghrelin estimula de forma dosis dependiente la secreción del ácido gástrico (Masuda y col., 2000), así como la movilidad gástrica (Masuda y col., 2000, Chen y col., 2005), aunque no en períodos de ayuno a pesar de su administración central o *i.v* (Chen y col., 2005). Este efecto es similar al provocado por otros péptidos gástricos, como son la gastrina o motilina, y contrarios a la colecistoquinina, secretina, GLP-1 o el péptido YY (Masuda y col., 2000). Aparentemente, los efectos que produce ghrelin están mediados por la activación del nervio vago, ya que su bloqueo (con atropina o por vagotomía) inhibe totalmente el efecto producido por ghrelin sobre el tejido gástrico (Date y col., 2001).

No obstante, en otros estudios con ratas, se ha visto que ghrelin ejerce un efecto contrario sobre la secreción de ácido gástrico, tanto si se administra de forma sistémica como central (Sibilia y col., 2002; Sibilia y col., 2003). También se ha comprobado que la administración *i.v.* de ghrelin no tiene efecto sobre la secreción basal de ácido gástrico, pero sí sobre la inducida por un derivado de la gastrina (Levin y col., 2005).

En este último año se ha demostrado que Des-G también regula la motilidad gástrica. La administración de Des-G, tanto *i.c.v.* como *i.v.*, provoca una reducción de la actividad del antrum sin alterar el tracto intestinal en estadíos de ayuno, y contrariamente al efecto de ghrelin, no influye en períodos de alimentación (Chen y col., 2005).

Regulación del balance energético y homeostasis metabólica

a) Regulación de la ingesta

El cerebro es el órgano encargado de controlar el apetito, y en particular, el hipotálamo se encarga del comportamiento alimenticio a través de complejos mecanismos de regulación (Kojima y Kangawa, 2005) que implicar el balance entre la expresión de neuropéptidos orexigénicos, como el neuropéptido Y (NPY), la hormona AgRP "agouti-releated peptide", orexina A y B o MCH (hormona concentradora de melanina), y neuropéptidos anorexigénicos como CART ("cocaine and amphetamine-Regulated Transcript") o α-MSH (hormona estimulante de melanocitos) (Konturek y

col., 2005).

Ghrelin administrado *i.c.v*., *i.v.* o vía subcutánea (*s.c*.) estimula la ingesta, aunque el efecto más potente es a través de la vía *i.c.v*. (Wern y col., 2001a).

Análisis inmunohistoquímicos revelan la existencia de neuronas productoras de ghrelin dentro del hipotálamo en la región del núcleo ARC (Lu y col., 2002), y en la región adyacente al tercer ventrículo situada entre las regiones dorsal, ventral, paraventricular y el núcleo ARC hipotalámico (Cowley y col., 2003). Existe también GHS-R1a en neuronas del ARC que expresan NPY y AgRP, implicadas en el desencadenamiento de las acciones orexigénica. Estas neuronas se comportan como dianas primarias de ghrelin dado que la administración central de ghrelin en ratas alimentadas *ad libitum* incrementa los mensajeros de ambas proteínas (Seoane y col., 2003).

Sobre el hipotálamo lateral ghrelin actúa sobre neuronas productoras de orexina aumentando la expresión de *c-fos* (Lawrence y col., 2002; Toshinai y col., 2006), pero no sobre la población de neuronas productoras de MCH (Seoane y col., 2003; Toshinai y col., 2006).

Sobre el papel de Des-G como regulador de la ingesta existen ciertas discrepancias. Los primeros estudios realizados en este sentido demostraron que Des-G administrado periféricamente reduce la ingesta (Asakawa y col., 2005, Chen y col., 2005), especulándose varios puntos de actuación para este péptido. Uno de ellos es la modificación, a nivel del hipotálamo, de la expresión de péptidos anorexigénicos como son CART o urocortin, ambos factores endógenos de saciedad del sistema nervioso central (Asakawa y col., 2005). Estos datos fueron respaldados por los presentados por Chen y colaboradores (2005), donde Des-G provoca un aumento en la expresión de *c-fos* en la región PVN, en neuronas que expresan urocortin o CART (Chen y col., 2005). Contrariamente a estos resultados se presenta un claro papel de Des-G como factor orexigénico, exclusivamente tras su administración *i.c.v.*, descartando así un posible papel del nervio vago en su regulación (Toshinai y col., 2006). Des-G actúa a través de neuronas productoras de orexina A y B en la región del hipotálamo lateral (Toshinai y col., 2006). Un dato destacable de este estudio es que estos autores intentaron analizar el papel de Des-G en animales en ayuno y tras administración periférica, tal y como se había realizado en los estudios que mostraban un papel anorexigénico de Des-G.

Toshinai y colaboradores (2006) no observaron ese efecto anorexigénico, y hasta el momento no se ha conseguido entender la causa de esta discrepancia en cuanto a los datos obtenidos utilizando los mismos modelos de experimentación.

b) Balance energético y metabolismo

El tratamiento crónico *i.c.v.* de ghrelin reduce el gasto energético, y un cambio en cuanto al metabolismo energético: se estimula la glucolisis y se inhibe la β-oxidación de ácidos grasos, lo que desencadena un aumento de la adiposidad corporal (Tschöp 2000; Kamegai y col., 2001b; Wern y col., 2001b).

El nervio vago también participa en la regulación del balance energético (Date y col., 2002). La administración *i.v.* de ghrelin aumenta la ingesta (Tschöp 2000; Nakazato y col., 2001; Wren y col., 2001a) a través de la ruta periférica que implica la activación del nervio vago, tracto solitario y la activación de neuronas del núcleo ARC (Williams y col., 2003). El proceso de vagotomía suprime completamente este efecto de ghrelin sobre la ingesta (Williams y col., 2003) (Fig. 18).

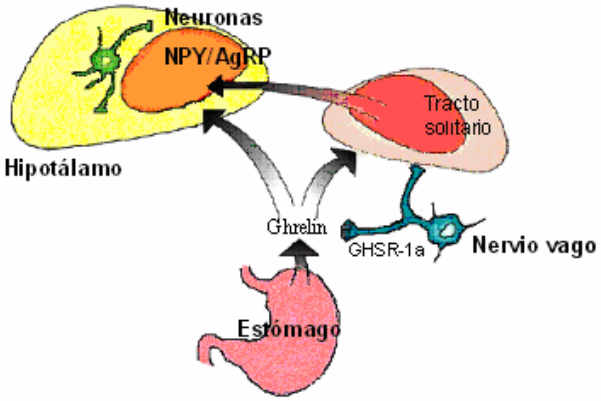


Figura 18. Ghrelin aumenta la ingesta a través tres vías diferentes. Ghrelin llega a la región del núcleo ARC en el hipotálamo, después de cruzar la BHE, y activa las neuronas productoras de NPY y AgRP, ambos péptidos orexigénicos. La segunda vía es a través del nervio vago. Las aferentes de las neuronas presentan receptores para ghrelin y se activa una ruta de estimulación del apetito con señales desde el tracto solitario que comunica con el hipotálamo. La tercera vía es a través de las neuronas productoras de ghrelin presentes en el hipotálamo.

Ghrelin influye de forma decisiva sobre el comportamiento alimenticio y los diferentes estados nutricionales, que en gran medida también regulan los niveles plasmáticos de ghrelin (Kojima y Kangawa, 2005).

A pesar de las diferentes variantes del péptido, son ghrelin y Des-G las dos formas mayoritarias en tejido y en plasma (Hosoda y col., 2000a). La concentración plasmática normal en humanos de la forma acilada es de 10-20 fmol/ml y la del total de ambas formas es 100-150 fmol/ml (Kojima y Kangawa, 2005). La liberación de ghrelin al plasma sigue un patrón rítmico, sus niveles se incrementan durante el ayuno y disminuyen tras la ingesta. Por ello, se sugiere que ghrelin actúa como señal de iniciación de la ingesta (Cummings y col., 2001; Tschöp y col., 2001a) (Fig. 19).

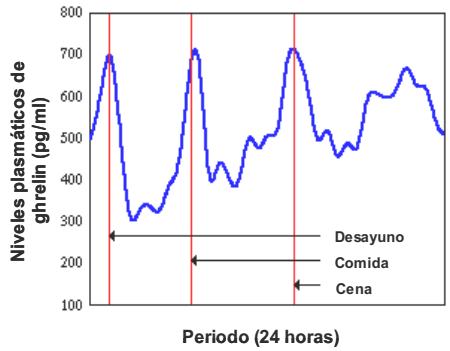


Figura 19. Representación de los niveles plasmáticos de ghrelin tras 24 horas de estudio. Como se puede observar en la figura los niveles aumentan previamente a la ingesta y se reducen tras ésta (Cummings y col., 2001).

Existen múltiples estudios en los cuales se analizan los factores que influyen en la variabilidad de los niveles plasmáticos de ghrelin. Entre estos factores se encuentran la naturaleza de los alimentos ingeridos, las alteraciones metabólicas o el estado nutricional del individuo (Lucidi y col., 2004; Kojima y Kangawa, 2005).

Por ejemplo, la distensión gástrica provocada por una ingesta de agua no altera los niveles plasmáticos de ghrelin, por el contrario la toma de alimentos ricos en grasas o bajos en proteínas incrementan y disminuyen, respectivamente, los niveles plasmáticos de ghrelin (Broglio y col., 2002).

c) Ghrelin y desórdenes metabólicos

Los niveles plasmáticos de ghrelin se ven alterados en patologías como la obesidad, la diabetes tipo 2, la anorexia o la bulimia. En pacientes obesos y diabéticos tipo 2 los niveles de ghrelin están disminuidos con respecto a individuos sanos (Tschöp y col., 2001b; Shiiya y col 2002); por el contrario, estados energéticamente negativos como la anorexia, bulimia o caquexia, presentan niveles altos de ghrelin, y sus valores vuelven a la normalidad cuando estos individuos presentan un estado más favorable, recuperan peso o simplemente tras una ingesta (Otto y col., 2001; Otto y col., 2005; Tanaka y col., 2002; Nagaya y col., 2001c, Shimizu y col., 2003a) (Tabla 2).

↑ Niveles plasmáticos de ghrelin	↓ Niveles plasmáticos de ghrelin
Caquexia (cáncer, fallo cardíaco)	Diabetes
Anemia, Bulimia	Obesidad
Síndrome Prader-Willi	

Tabla 2. Relación de los estados metabólicos en los que los niveles plasmáticos de ghrelin están alterados con respecto a individuos sanos.

La patología denominada Síndrome Prader-Willi (SPW), generada por la pérdida de uno o más genes parentales de la región q11-q13 del cromosoma 15, se caracteriza por diversos síntomas entre los que destacan la obesidad severa, la hiperfagia, el déficit de GH y un ligero retraso mental. Estos individuos presentan un apetito insaciable, lo que provoca obesidad severa que puede desencadenar en un incremento tanto en la morbilidad como la mortalidad cardiovascular (Nicholls y Knepper, 2001). Contrariamente a los individuos que presentan obesidad simple u obesidad causada por otras alteraciones genéticas, los individuos con SPW presentan altos niveles de ghrelin (Cummings y col., 2002; DelParigi y col., 2002). Éstos recuperan los valores plasmáticos normales tras la ingesta aunque solamente en el caso de individuos jóvenes con SPW (Haqq y col., 2003; Bizzarri y col., 2004). Poco se conoce sobre el mecanismo por el cual los niveles de ghrelin están alterados en SPW. El aumento de la ingesta se ha especulado como el motivo del incremento en los niveles plasmáticos de ghrelin (Cummings y col., 2002; DelPagi y col., 2002). Recientemente, estas especulaciones se han dirigido al metabolismo de la insulina, los individuos con SPW presenta niveles bajos de insulina que provocan en parte el aumento de los niveles de ghrelin (Goldstone y col., 2005). Otra posible explicación podría ser los niveles bajos de GH en estos individuos, aunque no se ha encontrado relación entre el déficit del eje GH/IGF-I y la hiperghrelinemia (Choe y col., 2005).

Regulación del metabolismo de la glucosa

Tras numerosos estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado un papel regulador de ghrelin sobre el metabolismo de la glucosa (Broglio y col., 2004; Gauna y col., 2004; Gauna y col., 2005; Murata y col., 2002; Patel y col., 2005). Igualmente, como se explicará a continuación, existe además una regulación por parte de la glucosa e insulina

sobre la producción de ghrelin.

a) Efecto de la glucosa e insulina sobre ghrelin

Se sabe que la secreción de ghrelin está regulada de forma directa por las concentraciones plasmáticas de glucosa y/o insulina (Date y col., 2002; Mohlig y col., 2002). Sin embargo existe un gran debate a este respecto. Por un lado, se postula que la insulina y/o glucosa no son los únicos factores que regulan los niveles plasmáticos de ghrelin, ya que existen otros factores implicados en la regulación de los niveles post-prandiales del mismo. Esta afirmación se extrae del análisis realizado en pacientes diabéticos tipo 1, en los que se cuantificaron seriadamente los niveles plasmáticos de ghrelin tras una primera ingesta de una comida de bajo índice glucémico, posterior ingesta de alimentos de alto índice glucémico y, finalmente, tras la administración *s.c.* de insulina. Se observó que la disminución de los niveles de ghrelin se producía tras la primera y segunda ingesta y no se alteraban estos niveles, ya reducidos, tras la inyección de insulina. Por lo tanto, no sólo la insulina influye en los niveles plasmáticos de ghrelin post-prandiales, sino que existen otros factores implicados aún por determinar (Spranger y col., 2003). Otros autores ven que las variaciones de los niveles plasmáticos de ghrelin no están relacionadas directamente con la glucosa o insulina, aunque concentraciones suprafisiológicas de insulina sí los reduzcan (Schaller y col., 2003). En otra vertiente se presenta un claro papel de la insulina y/o glucosa en la regulación de los niveles plasmáticos de ghrelin. En individuos normales o con diabetes tipo 2 la administración *i.v.* de glucosa reduce los niveles de ghrelin tras los primeros cinco minutos (Briatore y col., 2003). Como la respuesta de la insulina no ocurre hasta los 10 minutos, se deduce que la insulina no es uno de los principales factores que afecta a los niveles de ghrelin (Briatore y col., 2003). Por el contrario, en el estudio realizado por Flanagan y colaboradores (2003) se da mayor importancia a la insulina, ya que, independientemente de la concentración de glucosa, ésta reduce los niveles de ghrelin, aunque no descartan que la glucosa tenga un papel adicional. El aumento de insulina en individuos obesos reduce los niveles plasmáticos de ghrelin aún manteniendo la concentración de glucosa. Este efecto parece estar relacionado, aunque débilmente, con una inducción a la captación de glucosa y una mejora en la sensibilidad a insulina (Leonetti y col., 2004). El grupo de Murdolo y colaboradores (2003) también apuesta claramente por el papel regulador de la insulina sobre los niveles de ghrelin. La administración de insulina, a una concentración basal, es suficiente para reducir los niveles plasmáticos de ghrelin,

tanto en individuos normales como en diabéticos tipo 1. Así, la hiperfagia que sufren los diabéticos tipo 1 podría deberse al déficit de insulina, que a su vez provocaría el aumento de los niveles plasmáticos de ghrelin (Murdolo y col., 2003).

b) Efecto de ghrelin sobre el metabolismo de la glucosa e insulina

La administración de ghrelin reduce la secreción de insulina en humanos, a pesar del incremento de los niveles de glucosa en sangre (Broglio y col., 2001). Este efecto se ve también en páncreas de rata perfundidos (Egido y col., 2002). Reimer y colaboradores (2003) demostraron que ghrelin actúa negativamente sobre los niveles de insulina de forma dosis dependiente. El punto a destacar de este estudio es que ghrelin actúa sobre los niveles de insulina estimulados por glucosa, sin afectar su nivel basal (Reimer y col., 2003). Un efecto similar ocurre en islotes aislados de rata, donde ghrelin inhibe la secreción de insulina solamente en presencia de una alta concentración de glucosa (Colombo y col., 2003). Por el contrario, otros autores han visto que la administración de ghrelin *in vivo* o en islotes aislados de rata estimula la secreción de insulina (Date y col., 2002a; Lee y col., 2002). Ghrelin, *in vivo,* actúa de forma fisiológica sobre las células beta del páncreas, estimulando la secreción de insulina, dado que el rango mínimo de activación es 10^{-12} mol/l (Date y col., 2002a) y los niveles plasmáticos de ghrelin en rata oscilan entre $4x10^{-12}$ mol/l (Hosoda y col., 2000). El uso de diferentes dosis, modelos experimentales y/o modos de administración podría explicar las divergencias existentes en los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de ghrelin sobre el páncreas endocrino (Reimer y col., 2003).

En humanos, ghrelin presenta un efecto agudo sobre la reducción de los niveles de insulina y aumento de glucosa en sangre (Broglio y col., 2001). Este efecto se produce cuando ghrelin se inyecta de forma *i.v.* en individuos normales o con déficit de GH.

Des-G no provoca cambios sobre los niveles de glucosa ni sobre los de insulina, pero, sorprendentemente, el efecto provocado por ghrelin se bloquea completamente tras la administración conjunta, equimolar y en vías de inyección separadas de ambos péptidos, lo que demuestra un efecto antagónico de Des-G sobre la actividad de ghrelin en el metabolismo de la glucosa e insulina (Broglio y col., 2004; Gauna y col., 2004).

Estos resultados se vieron reforzados por los presentados por Gauna y colaboradores (2005) en los que ghrelin estimulaba de forma rápida y dosis dependiente la secreción de glucosa en cultivos primarios de hepatocitos. Esto apoya la hipótesis de

un efecto directo de ghrelin sobre la homeostasis de la glucosa en hígado (Gauna y col., 2005). Se observó además que Des-G inhibe la secreción de glucosa en hepatocitos, siendo capaz de antagonizar el efecto provocado por ghrelin, y también es capaz de suprimir la secreción de glucosa provocada por el glucagón (Gauna y col., 2005). Un dato muy importante en este estudio, realizado con cultivos primarios de hepatocitos, es que estas células no expresan GHS-R1a, por lo que una vez más y en otro tipo celular, cobra mayor fuerza la hipótesis que sugiere la existencia de otro u otros receptores que medien tanto las acciones de ghrelin como las de Des-G (Gauna y col., 2005). Asimismo, la administración de hexarelina, como análogo de ghrelin y que ejerce su efecto a través de GHS-R1a, no provocó ningún efecto sobre la secreción de glucosa en hepatocitos (Gauna y col., 2005), en concordancia con los datos obtenidos en humanos (Broglio y col., 2001).

En células de carcinoma hepático humano o de rata, ghrelin induce proliferación celular (Murata y col., 2002). El estudio de la vía de señalización intracelular que desencadena este efecto demostró una conexión de ghrelin con la vía de la insulina. Tras la unión de ghrelin a su receptor se induce una activación de mediadores de la ruta de la insulina como son IRS-1, GRB2 y MAPK (Murata y col., 2002). Además, la co-estimulación con ghrelin e insulina presenta un efecto aditivo sobre la activación de esta ruta metabólica (IRS-1/GRB2/MAPK), que aumenta la proliferación celular (Murata y col., 2002) (Fig. 20).

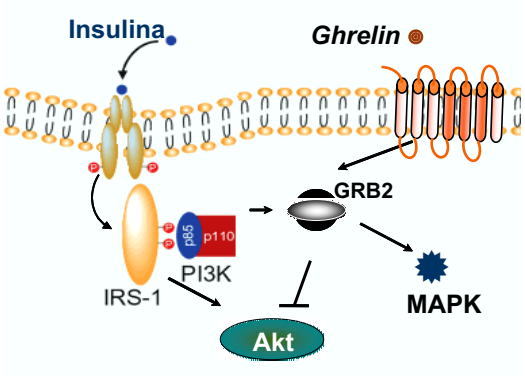


Figura 20. Representación de la implicación de ghrelin en la ruta de señalización de la insulina en hepatocitos propuesta por el estudio de Murata y colaboradores (2002). Tanto la insulina como ghrelin activan IRS-1, GRB-2 y PI3K, componentes de la vía de señalización de la insulina. La divergencia está en la activación de Akt por parte de la insulina y la inactivación de Akt tras el tratamiento con ghrelin.

En este mismo tipo celular también se demostró una asociación entre IRS-1 y PI3K provocada por la administración de ghrelin o insulina, pero sobre esta asociación el co-tratamiento no induce efecto sumatorio de ambos estímulos (Murata y col., 2002). Se encontró una importante divergencia en cuanto a la activación de Akt: la insulina activa esta proteína y, por el contrario, ghrelin la inhibe, aún a pesar de la presencia de insulina (Murata y col., 2002). La explicación de este efecto podría ser que ghrelin al incrementar la expresión del enzima fosfoenolpiruvatocarboxilasa (PEPCK), encargada de regular la gluconeogénesis, provocaría un efecto diabetogénico en estas células contrario al que pretende la insulina (Murata y col., 2002).

En adipocitos y preadipocitos 3T3-L1 ghrelin activa la ruta IRS-1/PI3K además de activar Akt, lo que conjuntamente favorece el transporte de glucosa al interior de estas células (Kim y col., 2004). Además, la co-estimulación con ghrelin e insulina activa en mayor grado la captación de glucosa por parte de los adipocitos (Kim y col., 2004). La activación de la ruta de PI3K/Akt parece ser la responsable de los efectos de ghrelin ya que el uso de wortmanina (inhibidor del encima PI3K) bloquea completamente este efecto (Kim y col., 2004).

En otro modelo de adipocitos, de origen epididimal, ghrelin estimula, de forma dosis dependiente y a través del receptor GHS-R1a, la captación de glucosa, tanto basal como inducida por insulina (Patel y col., 2005). En este modelo celular, Des-G no presenta ningún efecto sobre la captación de glucosa basal o inducida por insulina (Patel y col., 2005).

Regulación de la proliferación celular

Ghrelin y Des-G presentan efectos diversos sobre la proliferación celular. En estudios *in vitro* de líneas humanas de carcinoma de mama y carcinoma de tiroides que expresan el receptor de secretagogos de GH, ghrelin inhibe la proliferación celular (Cassoni y col., 2001; Volante y col., 2003). Un efecto similar se ha demostrado *in vitro* sobre una línea celular de carcinoma pulmonar, donde no sólo ghrelin reduce la proliferación en estas células, a pesar de que no expresan GHS-R1a, sino que los GHS peptídicos, no peptídicos, y también Des-G, inhiben la proliferación celular (Ghè y col., 2002). En un estudio con líneas humanas de cáncer de próstata, se han encontrado diferencias en cuanto a los efectos de ghrelin y Des-G sobre las diferentes líneas: ambos

péptidos reducen la proliferación en la línea DU-145 (Cassoni y col., 2004), no ejercen efecto sobre las células LNCaP (Cassoni y col., 2004) y presentan ambos efectos sobre la línea PC-3 dependiendo de la dosis administrada (Jeffery y col., 2002; Cassoni y col., 2004). Ghrelin no sólo es capaz de inhibir la proliferación basal, sino también la inducida sobre células endoteliales por el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) (Bagueira y col., 2004; Conconi y col., 2004).

Sobre otros muchos tipos celulares ghrelin presenta el efecto opuesto estimulando la proliferación celular, como es el caso de la línea cardiomiocitaria de origen embrionario H9c2 (Petterson y col., 2002), células hepáticas (Murata y col., 2001), células de Leyding (Barreiro y col., 2004), adipocitos (Zhang y col., 2004b; Kim y col., 2004), células de hipófisis de rata GH3 (Nanzer y col., 2004) u osteoblastos, MC3T3-E1 (Kim y col., 2005). Del mismo modo, en estudios *in vivo* e *in vitro*, ghrelin promueve en ratas la proliferación de neuronas tanto en la región dorsal de nervio vago como en la del tracto solitario (Zhang y col., 2004a; Zhang y col., 2005b).

Se ha determinado en alguno de estos modelos celulares la ruta metabólica que regula la estimulación de la proliferación celular por parte de ghrelin, y ésta implica a los mediadores PI3K, Akt y MAPK quinasa (Murata y col., 2001; Pettersonn y col., 2002).

Regulación de la función cardiovascular

El eje GH/IGF-I tiene un papel importante en el desarrollo, mantenimiento de la estructura y funcionamiento cardíaco (Colao y col., 2001). Pacientes con déficit en GH presentan alteraciones en la función cardiovascular, que se reestablece tras terapia de sustitución (Tivesten y col., 2000). Sin embargo, en pacientes sin déficit de GH, la administración exógena de GH no siempre resulta efectiva para el tratamiento de las patologías cardíacas (King y col., 2001; Marleau y col., 2006), por lo que tratamiento con GHS sintéticos se ha establecido como alternativa para la secreción de GH de forma más fisiológica (Marleau y col., 2006). El descubrimiento de ghrelin como potente secretagogo de GH (Kojima y col., 1999) y la demostración de la existencia de uniones específicas para los GHS en tejido cardíaco (Ghigo y col., 1999) dio pie al análisis de las posibles funciones cardiovasculares de ghrelin y los GHS (Cao y col., 2006).

En un primer momento se pensó que la actividad de ghrelin y los GHS sobre el sistema cardiovascular era de forma indirecta, debido a su efecto sobre la liberación de GH y la posterior mediación de IGF-I (Nagaya y col., 2001a), ambos esenciales para el crecimiento miocárdico y la homeostasis metabólica (Colao y col., 2001). Posteriormente, la posibilidad de que ghrelin ejerciese efectos directos sobre el sistema cardiovascular vino abalada por la presencia de receptores específicos en corazón, vasos sanguíneos (Nagaya y col., 2001a) y miocardio; uno de los tejidos con una expresión de receptores para ghrelin más elevada (Gnanapavan y col., 2002). Esta posible actividad directa de ghrelin y los secretagogos de GH sobre el tejido cardíaco, viene avalada por los resultados de Locatelli y colaboradores (1999), que mostraban que la hexarelina es capaz de unirse a los GHS-R presentes en corazón y promover un efecto cardioprotector frente al daño provocado por el proceso de isquemia/reperfusión. Este efecto de la hexarelina es similar al que produce la GH, aunque a través de vías independientes, como se demostró en ratas hipofisectomizadas, donde la administración de hexarelina provoca igualmente un efecto cardioprotector independiente de la presencia de GH (Locatelli y col., 1999). Por el contrario, un estudio posterior mostró que la hexarelina presenta un efecto vasoconstrictor que no está mediado por el GHS-R sino por el receptor multifuncional CD36, que no es capaz de unir ghrelin (Bodart y col., 2002; Demers y col., 2004). Este receptor, de la familia de receptores de membrana tipo-B o "*scavenger receptors*", se expresa específicamente en el tejido adiposo, plaquetas, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células del endotelio microvascular. El efecto de la hexarelina se analizó en corazones perfundidos de ratas Sprague-Dawley y de ratones cepa C57BL/6, ambos modelos control, y en sus correspondientes modelos genéticamente deficientes para CD36: ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratones knockout. Su efecto vasoconstrictor era dosis dependiente, mediado en parte por canales de calcio tipo L y proteína quinasa C, y sólo ocurría en los animales no deficientes en CD36. Con estos datos se mostraba, por primera vez, la posible implicación del receptor CD36 en el efecto vasoconstrictor presente en los estados de hipercolesterolemia y aterosclerosis (Bodart y col., 2002).

a) Parámetros hemodinámicos

Los primeros estudios sobre el efecto de ghrelin sobre el sistema cardiovascular se realizaron tanto en humanos como en rata. Tras su administración *i.v.* (en una sola dosis) ghrelin provocaba cambios en algunos factores hemodinámicos. Causaba una

reducción de la presión arterial e incrementaba el rendimiento cardíaco sin alterar ni la frecuencia cardíaca ni la fracción de eyección (Nagaya y col., 2001a; Nagaya y col., 2001d). Tampoco se observaron modificaciones en los valores medios de la presión arterial o la presión capilar pulmonar (Nagaya y col., 2001a).

La reducción de la media de la presión arterial provocada por ghrelin podría deberse a la intervención indirecta de IGF-I, hormona que induce la síntesis de óxido nítrico y vasodilatación. Pero en humanos sanos, y ratas con déficit en GH, la administración de ghrelin provoca hipotensión sin variar los niveles plasmáticos de IGF-I. Estos resultados sugieren que este efecto no está mediado por el eje GH/IGF-I (Nagaya y col., 2001a, Nagaya y col., 2001b).

Por otro lado, la administración de ghrelin causa un balance energético positivo a través de la estimulación de la ingesta, que podría contribuir a la mejora de la caquexia, estado catabólico que se caracteriza por la pérdida de peso y masa muscular asociada con cambios hormonales y activación de citoquinas, y que constituye un importante determinante pronóstico independiente en individuos con fallo cardíaco crónico (CHF) (Nagaya y Kangawa, 2003a). La administración crónica de ghrelin, durante tres semanas, se acompaña de una mejoría en la disfunción ventricular izquierda acompañada de cambios estructurales cardíacos. Estimula el aumento del grosor de la pared posterior y reduce la dilatación ventricular, que determina un menor estrés de la pared en ratas con CHF (Nagaya y col., 2001d), además induce hipertrófica cardíaca sin desarrollar fibrosis (al igual que el eje GH/IGF-I) (Nagaya y col., 2001c; Nagaya y col., 2001d).

El estudio realizado por Wiley y Davenport (2002) describe un potente efecto vasodilatador de ghrelin en arterias humanas aisladas que contrarresta el efecto provocado por la endotelina-1, un potente agente vasoconstrictor endotelio-dependiente (Wiley y Davenport. 2002). Pero ¿a través de qué mecanismo ghrelin ejerce este efecto vasodilatador? En pacientes con déficit de GH la administración exógena de esta hormona provoca una mejoría en la disfunción endotelial, posiblemente debido a que su mediador IGF-I provoca vasodilatación por estimulación directa de la síntesis de óxido nítrico (NO), compuesto con propiedades anti-aterogénicas (Boger y col., 1996). Ghrelin podría por tanto estar actuando a través de este eje. Sin embargo, el incremento de expresión del receptor de ghrelin en zonas que presentan aterosclerosis apoya la

teoría de un efecto directo de ghrelin sobre el endotelio vascular (Katugampola y col., 2001).

Shimizu y colaboradores (2003) estudiaron el efecto de la administración de ghrelin sobre la disfunción endotelial en ratas Sprague-Dawley y *dwarf* (deficientes en GH). Encontraron, en ambos modelos, que el tratamiento con ghrelin mejoraba la disfunción endotelial además de incrementar la expresión del enzima óxido nítrico sintasa endotelial, responsable de la producción de óxido nítrico. Por lo tanto quedaba demostrado el efecto directo y beneficioso de ghrelin sobre la disfunción endotelial de forma independiente al eje GH/IGF-I (Shimizu y col., 2003b).

b) Cardioprotección

En ratas, ghrelin presenta *in vivo* un mecanismo cardioprotector frente al daño miocárdico provocado por la administración de isoproterenol (Chang y col., 2004b). Los mecanismos responsables no están claros, aunque sabemos que ghrelin provoca una recuperación de los parámetros hemodinámicos y metabólicos alterados tras el tratamiento con isoproterenol (Chang y col., 2004b).

En corazones aislados sometidos a isquemia/reperfusión, la administración de ghrelin mejora las condiciones hemodinámicas y metabólicas alteradas (Frascarelli y col., 2003; Chang y col., 2004a). La hexarelina reduce también significativamente el porcentaje de masa necrótica, mediante un mecanismo mediado por el enzima proteína kinasa C (Frascarelli y col., 2003). Ni el secretagogo MK-0677 ni Des-G presentaron efectos sobre este modelo de estudio. La administración de ghrelin o hexarelina no provocó cambios significativos sobre las características hemodinámicas a pesar de ser utilizados a dosis altas (Frascarelli y col., 2003). Se sugiere con este estudio *in vitro* que el efecto de ghrelin *in vivo* de mejora de la fracción de eyección que veían otros autores podría deberse a la reducción de la post-carga secundaria a la vasodilatación (Frascarelli y col., 2003) y no a un efecto directo.

c) Experimento con cardiomiocitos aislados

Pettersson y colaboradores (2002) llevaron a cabo los primeros estudios sobre los efectos de ghrelin en cultivos de cardiomiocitos. Se realizaron sobre la línea celular cardiomiocitaria H9c2, una línea embrionaria derivada de ventrículo de rata que presenta propiedades tanto de células de músculo esquelético como de células cardíacas (Pettersson y col., 2002). La administración de hexarelina y ghrelin estimulaba la

incorporación dosis dependiente de timidina, demostrando así un efecto de ambos péptidos sobre la proliferación celular en las células H9c2, aunque el efecto era más marcado en el caso de la administración de hexarelina (Pettersson y col., 2002). También analizaron el efecto de otros análogos y antagonistas del receptor de secretagogos de GH sobre la proliferación de los cardiomiocitos H9c2. Contrariamente a lo que cabría esperar, el compuesto EP51389 (un derivado truncado de la hexarelina), al igual que MK-0677, inhibía la proliferación cardiomiocitaria. Incluso determinaron que el compuesto MK-0677 administrado conjuntamente con la hexarelina inhibe completamente el efecto de ésta sobre la proliferación (Pettersson y col., 2002).

Por otra parte, observaron que el compuesto EP80317, capaz de desplazar la unión de ^{125}I-ghrelin en hipófisis, pero no de promover la secreción de GH, aumentaba la proliferación celular en la línea H9c2 (Pettersson y col., 2002). Lo más sorprendente de este estudio, donde se presenta un efecto directo tanto de los GHS de origen peptídico como de ghrelin, es que la línea cardiomiocitaria embrionaria H9c2 no expresa el receptor clásico de secretagogos de GH, lo que hace suponer la existencia de un nuevo receptor para este péptido en cardiomiocitos, que estaría implicado en el efecto proliferativo inducido por ghrelin (Pettersson y col., 2002).

Baldanzi y colaboradores (2002) han demostrado también que ghrelin presenta efectos directos sobre la línea cardiomiocitaria H9c2, a pesar de no presentar el receptor GHS-R1a. Ghrelin previene la apoptosis inducida por doxuribicina (un agente pro-apoptótico para cardiomiocitos tanto *in vivo* como *in vitro*), o tras serodeprivación *in vitro*. Este efecto también está presente tras el tratamiento de células endoteliales PAE (Baldanzi y col., 2002).

En cultivos primarios de cardiomiocitos adultos de cobaya ghrelin inhibe de forma dosis dependiente la apoptosis inducida tras la activación de Fas, característica en la cardiopatía isquémica en fase dilatada o en la disfunción cardíaca inducida por doxorubicina (Baldanzi y col., 2002).

Ghrelin en su actividad como factor de supervivencia sobre las H9c2 y células endoteliales PAE tras el tratamiento con doxorubicina activa dos rutas metabólicas. Una de las rutas implica la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), y en la otra las enzimas fosfo-inositol-3 quinasa (PI3K) y Akt (Baldanzi y col., 2002).

En resumen, no sólo se sabe que ghrelin actúa sobre la función cardiovascular a través de la regulación de parámetros hemodinámicos de manera independiente de GH, sino que también presenta efectos directos sobre cardiomiocitos, activando mecanismos de cardioprotección frente a la apoptosis inducida por ejemplo por procesos de isquemia-reperfusión o por tratamientos citotóxicos. Por otro lado, ghrelin también actúa como regulador del balance energético y la homeostasis metabólica a nivel sistémico. El estudio de papel de ghrelin sobre el metabolismo cardiomiociotario y la patogénica del síndrome metabólico podría resultar clave a la hora de esclarecer la relación existente entre este péptido y la patogenia de alteraciones metabólicas (como la obesidad o diabetes) relacionadas con el síndrome metabólico, dado que hoy día este aspecto no está demasiado claro.

d) Actividad cardiovascular de Des-acil ghrelin

Una de las primeras demostraciones sobre la bioactividad de Des-G fue la descrita por Baldanzi y colaboradores (2002), que demostraron que Des-G comparte efectos con ghrelin, dado que muestra también un efecto cardioprotector en las células H9c2 y las células PAE activando las mismas rutas metabólicas que ghrelin (Baldanzi y col., 2002). Se ha demostrado también que la administración de Des-G, al igual que la de ghrelin, en el núcleo tracto solitario causa una reducción de la media de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca, lo que sugiere que este efecto provocado por ambos péptidos en igual forma no está mediado por GHS-R (Tsubota y col., 2005).

En músculo papilar, Des-G ejerce efectos ionotrópicos negativos en mayor grado que ghrelin. Este efecto negativo parece estar mediado por metabolitos del enzima ciclooxigenasa producidos en las células endoteliales, como las prostaglandinas, ya que tras la administración de Des-G aumenta la concentración de 6-keto-PGF1α y el pretratamiento con indometacin, como inhibidor de la ciclooxigenasa, bloquea completamente la acción de este péptido (Bedendi y col., 2003).

Modelos knockout y transgénicos

Existen varios modelos de ratones knockout y animales transgénicos en los que se ha intentado determinar el papel que juegan tanto ghrelin y Des-G como el receptor GHS-R en el organismo (Smith, 2005).

El ratón knockout de ghrelin realizado por Sun y colaboradores (2003), dio una llamada de atención al estudio del papel fisiopatológico de ghrelin en el organismo. A ghrelin se le atribuyen múltiples funciones pero, contrariamente a lo esperado, la construcción de su modelo knockout parece quitar importancia a la presencia de ghrelin en el organismo. Estos ratones son aparentemente normales, sanos, y se reproducen con normalidad. Todos aquellos procesos en los que se presuponía un papel clave o crítico de ghrelin, como por ejemplo: el crecimiento, el comportamiento, la reproducción, entre otros, no están afectados por la delección completa de ghrelin. Estos resultados podrían explicarse a través de la activación de otras rutas supletorias o redundantes con el objetivo de cubrir la carencia de ghrelin (Sun y col., 2003).

Wortley y colaboradores (2004) determinaron que la supresión de ghrelin no altera la ingesta, aunque sí provoca un cambio en la preferencia sobre la utilización de grasa frente a los carbohidratos como sustrato metabólico para el mantenimiento del balance energético, tras la ingesta de una dieta rica en grasas.

Con el descubrimiento de la obestatina se ha propuesto una nueva hipótesis sobre los ratones knockout de ghrelin. La obestatina tras su administración reduce la ingesta, efecto contrapuesto al que ejerce ghrelin, por lo tanto, como ambos péptidos están codificados en el mismo gen, cuando se produce el knockout de ghrelin también se elimina la expresión de la obestatina. Esto podría explicar la ausencia de cambios en el ratón knockout de ghrelin, ya que su antagonista está también deleccionado (Zhang y col., 2005a; Nogueiras y Tschöp, 2005).

El estudio para analizar la implicación del GHS-R en la regulación de la secreción de GH, ingesta y adiposidad, se realizó en un primer momento con ratas transgénicas. Se bloqueó selectivamente la expresión del GHS-R en el núcleo ARC a través de expresión de la secuencia antisentido del GHS-R. Los individuos transgénicos presentaron una reducción tanto en el peso corporal como en el porcentaje del tejido adiposo, todo ello debido a una menor ingesta (Fig. 21). No presentan respuesta hipotalámica a la administración de los GHS y los niveles plasmáticos de GH e IGF-I están reducidos en hembras (Shuto y col., 2002).

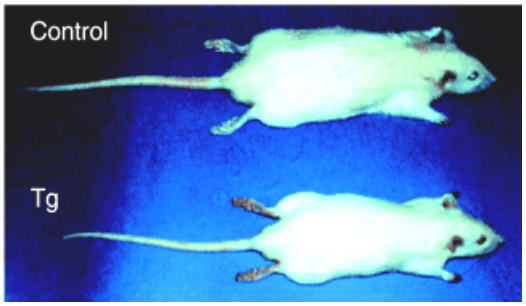


Fig. 21. Fotografía de una rata control y una rata transgénica para el gen del GHS-R, ambos individuos de 6 semanas de edad. La rata transgénica presenta un menor peso y tamaño corporal.

El ratón knockout para el gen del GHS-R presenta una anulación completa de la respuesta de ghrelin sobre la secreción de GH y la inducción del apetito. Todo ello a pesar de que estos individuos tienen un apetito y una composición corporal igual que los animales de fenotipo salvaje, presentando por tanto un crecimiento y desarrollo corporal normal (Sun y col., 2004).

Estos ratones sí presentaron una ligera disminución en cuanto al peso corporal, que se ha relacionado esto con una disminución, también ligera, de los niveles de IGF-I alterando en parte procesos anabólicos (Sun y col., 2004), equivalente a lo analizado en las ratas transgénicas.

Se ha estudiado también el efecto provocado por la sobreexpresión de Des-G en ratones transgénicos, donde los niveles de Des-G en plasma aumentan entre 10 y 40 veces más que los ratones normales (Ariyasu y col., 2005). La sobreexpresión de Des-G cambia el fenotipo de estos ratones, reduciendo su peso y tamaño corporal (Ariyasu y col., 2005). Los niveles plasmáticos de IGF-I son más bajos que en ratones normales, y los niveles de GH presentan una tendencia a ser menores, pero su reducción no es estadísticamente significativa. La posible explicación de los bajos niveles de IGF-I puede ser la disminución en la respuesta de secreción de GH por parte de ghrelin en los ratones transgénicos con respecto a los controles, aunque la respuesta provocada tras la administración de GHRH no está alterada (Ariyasu y col., 2005).

Justificación y Objetivos

Se puede decir que los péptidos derivados del gen de ghrelin son muy jóvenes en el área de la investigación biomédica. La mayor parte de los estudios que se conocen sobre ghrelin y sus derivados se centran sobre el importante papel a nivel del eje hipotálamo-hipofisario regulando la secreción de GH, la ingesta y la homeostasis metabólica. A nivel cardiovascular, los primeros estudios realizados se dirigieron principalmente al análisis de la modulación *in vivo* de los factores hemodinámicos por parte de ghrelin, sin analizar el efecto directo de ghrelin sobre las células cardíacas. Por ello, nuestro trabajo se centró en analizar *in vitro* posibles efectos de la administración de los péptidos ghrelin, Des-G y obestatina, todos ellos sintetizados a partir del gen de ghrelin, sobre la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario.

Los objetivos concretos que nos hemos propuesto en este trabajo han sido:

1. Determinar si existe expresión génica, síntesis proteica y secreción de ghrelin en cardiomiocitos.

2. Determinar si existe expresión génica del receptor de secretagogos de GH (GHS-R) en cardiomiocitos.

3. Analizar el posible efecto de ghrelin y Des-G sobre la proliferación y viabilidad cardiomiocitaria.

4. Analizar el posible papel regulador de ghrelin y Des-G sobre el metabolismo cardiomiocitario, en concreto el metabolismo de lípidos y de glucosa.

5. Analizar la expresión del receptor de obestatina GPR39 en cardiomiocitos.

6. Analizar el posible efecto de la obestatina sobre la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario.

Material y Métodos

Todos los productos utilizados en la realización de esta tesis doctoral se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Mo, USA), Life Technologies (Poole, UK), SAFC Biosciences (Andover, UK) Santa Cruz Bioctechnology (Santa Cruz, CA, USA), Upstate Biotechology (Lake Placid, NY, USA), Merck (Darmstadt, Germany), Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA, Amersham Pharmacia Biotechnology Inc.(Bioscience, Freiburg, Germany), Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA), Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), (Saizen, Serono, Madrid, España), Becton & Dickinson (San José, CA, USA) y BioRad Laboratorios (Hercules, CA, USA). Durante el desarrollo de este apartado de material y métodos se especificará cada producto con su correspondiente casa comercial utilizando su nombre corto como referencia.

Cultivos celulares

1. Células HL-1

La línea celular de cardiomiocitos de ratón HL-1 fue donada por el Doctor W.C. Claycomb (Lousiana S.U., Medical Center, N. Orleans LA). Esta línea celular deriva de una línea de cardiomiocitos atriales de ratón adulto (cepa C57BL/6J), denominada AT-1. Presentan la característica de ser capaces de dividirse manteniendo el fenotipo cardíaco específico (expresión de la cadena pesada de miosina, α-actina cardíaca y connexina 43) y mantenimiento de la actividad contráctil. Todo esto hace que la línea celular HL-1 sea un sistema experimental óptimo para el estudio de la función cardíaca a nivel celular y molecular.

El cultivo de estas células se realiza en platos de cultivo previamente tratados con una matriz de fibronectina (Sigma) disuelta en una solución de gelatina al 0.02%. La matriz extracelular permite a las células adherirse correctamente a la superficie de la placa de cultivo. El medio que se utiliza para su mantenimiento es el medio comercial Claycomb (SAFC) que contiene todos los elementos necesarios para el crecimiento correcto de la línea celular HL-1:

- 10% de suero bovino fetal (FBS) (Life Technologies).
- Factor de crecimiento endotelial (ECGS) (50 µg/ml) (Upstate), favorece el crecimiento y las conexiones necesarias para la división celular.

- Ácido retinoico (1 µM), insulina (15 µg/ml), aminoácidos no esenciales (0.1 mM) (productos de Sigma).

Además de estos factores ya incorporados en el medio de cultivo, éste debe suplementarse con:

- Noradrenalina (0.1 mM) que contribuye al mantenimiento del fenotipo diferenciado y estimula las contracciones de los cardiomiocitos (Sigma).
- L-glutamina (Sigma) y antibióticos: penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (P/S) (Sigma).

La combinación de estos elementos constituyen el medio de cultivo completo, que debe ser renovado diariamente para un crecimiento correcto de las células, además de mantenerlas bajo las siguientes condiciones de cultivo: 37º C de temperatura, 5% de CO_2, 95% de aire y 95% de humedad relativa.

Cuando las células presentan una confluencia adecuada (70-80%) para el desarrollo de los ensayos y los tratamientos, se reemplaza el medio completo por el medio de cultivo de deprivación o medio base. Este medio de cultivo está formado por dos partes: ExCell 320 parte A y parte B (Medio A+B) (SAFC), y carece de los factores o suplementos anteriormente detallados.

2. Cultivo primario de cardiomiocitos humanos

El cultivo primario de cardiomiocitos humanos se realizó a partir de muestras obtenidas de pacientes del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, tras el consentimiento informado de los mismos.

Durante la cirugía de bypass coronario se realiza la cateterización de la aurícula derecha, por lo que se descarta el apéndice atrial u orejuela. Este tejido es el que utilizamos para realizar el cultivo primario de cardiomiocitos auriculares humanos.

La orejuela se secciona en pequeñas porciones para facilitar la disgregación de los cardiomiocitos. Posteriormente se realiza una primera digestión enzimática de 10 minutos y luego cuatro digestiones de cinco minutos; cada una de ellas con 1 ml de solución enzimática compuesta por 0.25% de tripsina (Sigma), 0.15% de colagenasa (Sigma) y 0.02% de glucosa (Sigma) disueltas en tampón fosfato salino (PBS). Tras cada digestión, se retira el sobrenadante que contiene las células disgregadas que se centrifugan durante 5 minutos a 580g y se resuspenden en medio de cultivo comercial,

Iscove's modified Dulbecco's (Sigma), suplementado con 10% FBS, 0.1 mM de β-mercaptoethanol (Sigma) y antibióticos.

El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Médium (DMEM) sin suplementos fue utilizado como medio de deprivación para este tipo celular.

Tratamientos celulares en la línea celular HL-1.

- Análisis de la actividad metabólica.

Se realizó el tratamiento con ghrelin, Des-G y obestatina en la línea celular HL-1 para analizar su efecto sobre la proliferación celular. Tras 12 horas de serodeprivación, las dosis de ghrelin utilizadas fueron: 1 pM, 1 nM, 10 nM y 1 μM (Sigma) durante 72 horas o ghrelin y Des-G (Phoenix) a las dosis de 0.5 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM y 3 μM durante 48 horas. El tratamiento con obestatina (Phoenix) se realizó durante 48 horas con el siguiente rango de dosis: 1 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μM, 2,5 μM y 5 μM. Cuatro horas antes de la finalización de los tratamientos se realizó el ensayo MTT (véase apartado H de técnicas de análisis).

- Análisis del ciclo celular.

Se analizó la implicación de la obestatina sobre el ciclo celular en la línea cardiomiocitaria HL-1.

Tras 12 horas de serodeprivación se realizó el tratamiento con obestatina durante 24 horas a las dosis de 10 nM, 100 nM, 1 μM y 5 μM. Transcurrido el tiempo de tratamiento las muestras se procesaron para el análisis por citometría de flujo (véase apartado I de técnicas analíticas).

- Estudios de apoptosis celular

Se realizaron dos estudios de inducción de apoptosis analizados posteriormente con la técnica semicuantitativa de RT-PCR y la tinción vital Hoechst.

a) Mediante la técnica RT-PCR se analizó el efecto del tratamiento con agentes pro- y anti-apoptóticos sobre los niveles de expresión de ARN mensajero de ghrelin en la línea HL-1.

Puntos de análisis y dosis:

◙ Control ◙ AraC (100 μM) ◙ GH recombinante humana (1 μg/ml) (Saizen) + AraC.

Se realizó un pretratamiento de 12 horas con GH recombinante humana (1 µg/ml) (Saizen) en medio A+B como agente anti-apoptótico. Tras este tiempo se realizó el tratamiento de 12 horas con 100 µM del agente citostático arabinósido de citosina (AraC) (Upjonh) en A+B, que promueve la apoptosis celular. Posteriormente se procesaron las muestras siguiendo los pasos del apartado B de técnicas de análisis.

b) En el apartado de tinción vital Hoechst se analizó el efecto del tratamiento con ghrelin durante 24 horas o el pretratamiento con ghrelin, Des-G o la combinación de ambos sobre la inducción de apoptosis provocada por AraC. Para ello se realizó un pretratamiento de las células HL-1 durante 12 horas en medio A+B con ghrelin, Des-G o la combinación de ambos péptidos, y posteriormente se realizó el tratamiento conjunto de los péptidos con el AraC durante otras 12 horas.

Puntos de análisis y dosis:

- Control
- AraC (100 µM)
- Ghrelin (0.1 µM)
- Des-G (0.1 µM)
- Ghrelin +AraC
- Des-G+AraC
- Ghrelin+Des-G+AraC

Transcurrido el tiempo de tratamiento se realizó la tinción vital Hoechst siguiendo los pasos descritos en el apartado I de técnicas analíticas.

De forma similar, se realizó el estudio de apoptosis en células HL-1 tratadas con obestatina a las dosis: 100 nM, 500 nM, 1 µM y 5 µM durante 48 horas.

- Análisis del metabolismo de lípidos

Analizamos el efecto del tratamiento con ghrelin, Des-G y obestatina sobre el metabolismo de lípidos en cardiomiocitos HL-1.

Para ello se deprivaron las células durante 16 horas y posteriormente se realizaron los estudios dosis respuesta con los péptidos. El análisis se realizó durante 15 minutos de tratamiento con las siguientes dosis: 0.05 µM, 0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM y 3 µM de ghrelin o Des-G. El análisis del tratamiento conjunto de ghrelin y Des-G se realizó utilizando las dosis altas 0.5 µM, 1 µM y 3 µM durante 15 minutos de tratamiento. Para el estudio del efecto de obestatina se utilizaron las siguientes dosis: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 3µ M y 5µ M durante 30 minutos de tratamiento.

Todas las muestras se procesaron según las indicaciones especificadas en el apartado de técnicas analíticas.

- Análisis del metabolismo de la glucosa

a) Se analizó la implicación de ghrelin, Des-G u obestatina en el metabolismo de la glucosa y la insulina tras 16 horas de serodeprivación. Los tratamientos realizados con ghrelin y Des-G para el estudio del metabolismo de la glucosa y la señalización intracelular fueron los siguientes:

- Control
- Des-G (3 μM) durante 30 minutos
- Ghrelin (30')+Insulina (1h)
- Ghrelin (30')+Des-G (30')+Insulina (1h)
- Ghrelin (3 μM) 30 minutos
- Insulina (100 nM), 1 hora
- Des-G (30')+ Insulina (1h)
- Ghrelin+ Des-G (ambos 30')

Para el estudio del efecto de obestatina sobre el metabolismo de la glucosa se utilizaron las siguientes dosis:

- Control
- Obestatina (100 nM, 1 μM, 3 μM y 5 μM), 30 minutos
- Insulina (100 nM), 1 hora

Tras la finalización de los tratamientos las muestras fueron procesadas según la técnica de análisis utilizada: Ensayo de incorporación de glucosa o Western Blot.

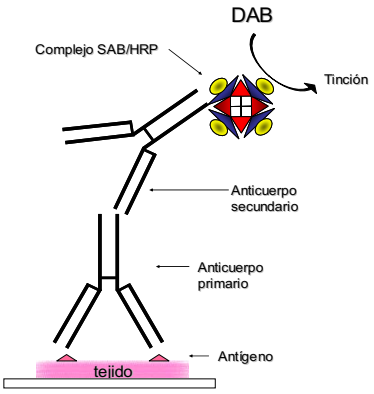
Técnicas analíticas

A) Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica consiste en analizar la presencia de un antígeno en el material de estudio, bien sean secciones tisulares (inmunohistoquímica) o cultivos celulares (inmunocitoquímica), basándose en la interacción específica antígeno-anticuerpo. La detección se realiza a través de una reacción colorimétrica, producida por el enzima unido al anticuerpo que reconoce al antígeno tras la administración de su sustrato.

En el desarrollo de la técnica se utiliza un anticuerpo primario que se une específicamente al antígeno objeto de interés, formando una primera capa. A continuación, se añade el anticuerpo secundario, unido al complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (SABC/HRP), que reconoce anticuerpo primario. Para la

visualización del antígeno se añade un cromógeno diaminobenzidina (DAB), que reacciona con el peróxido de hidrógeno en presencia de la enzima peroxidasa del complejo SABC/HRP para formar un precipitado de color oscuro. El producto final de tales reacciones enzimáticas es un precipitado visible a microscopía óptica convencional.



Representación gráfica del proceso de inmunohistoquímica.

Para el análisis inmunohistoquímico de ghrelin se realizaron cortes histológicos de estómago y corazón, tanto humano como de ratón. Las muestras de tejido humano se obtuvieron, tras la autorización del Doctor Jerónimo Corteza, a partir de autopsias realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Una vez extraído el tejido, pasa a ser fijado en una solución tampón de formaldehído al 4% durante 24 horas. El tejido se deshidrató en baños de alcohol a concentraciones crecientes, y se incluye en parafina según la técnica histológica habitual.

Para el desarrollo de la técnica se realizaron secciones histológicas de 5 µm de espesor, que posteriormente se desparafinaron, hidrataron y procesaron en el microondas, durante tres ciclos de cinco minutos en un baño de tampón citrato sódico 0.01 M (pH 6.0) a 750 vatios.

La detección antigénica se realizó con los siguientes pasos: a) incubación de una hora con el anticuerpo primario policlonal de cabra que reconoce ghrelin (Santa Cruz) preparado en la solución comercial Dakopatts en una dilución 1:500. b) incubación con agua oxigenada al 3% (Merck) durante 10 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. c) 30 minutos de incubación con el anticuerpo secundario de burro anti-

cabra, marcado con biotina, diluido 1:100 en tampón que contiene 0.05 M Tris-base pH 7.6 y NaCl 0.3 M (TBS). d) incubación con el complejo formado por estreptavidina-biotina-peroxidasa (SABC/HRP) y e) solución 3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB) (Merck) durante 10 minutos.

Tras cada incubación se realizaron dos lavados en TBS, durante 5 minutos, y tras la incubación con DAB, las muestras se lavaron en agua destilada.

Los controles negativos de la técnica se realizaron utilizando el anticuerpo primario bloqueado por preadsorción con su antígeno (ghrelin 10 μM, durante 24 horas a 4º C) u omitiendo algún paso esencial en la técnica.

Inmunocitoquímica

Las células HL-1 y el cultivo primario de cardiomiocitos humanos se despegaron de los platos de cultivo mediante la utilización de tripsina, un enzima que rompe las uniones de las células a la matriz de fibronectina. Consecutivamente, se realizó un recuento de células, ya que para el análisis por inmunohistoquímica se utiliza un número aproximado de 5000 células por ml.

Una vez determinado el número de células necesarias, y dispuestas éstas en un volumen adecuado, se sembraban en portaobjetos y se mantenían a 37º C hasta que la adhesión se completaba. Las células sufrieron un proceso de fijación por inmersión en formaldehído al 10% preparado en tampón PBS, durante 15 minutos, 5 minutos en PBS, 4 minutos en metanol frío (-20º C), en acetona fría (-20º C) durante 2 minutos y finalmente dos lavados de cinco minutos en PBS. Posteriormente, las muestras se procesaron en el microondas durante 10 minutos a 750 vatios en tampón citrato sódico 0.01 M.

La detección antigénica de las muestras se realizó siguiendo el mismo protocolo que se utilizó para las muestras de tejido, con la salvedad del anticuerpo primario de cabra anti-ghrelin, que se utilizó más concentrado (dilución 1:50).

Para confirmar, en el cultivo primario de cardiomiocitos humanos, que las células inmunorreactivas a ghrelin eran cardiomiocitos (y no células contaminantes del cultivo primario) se realizó una tinción con el anticuerpo primario de cabra que reconoce la secuencia peptídico cercana al fragmento C-terminal de la cadena pesada de la miosina humana (MHC, dilución 1:50) (Santa Cruz).

Los controles negativos de la técnica se realizaron utilizando el anticuerpo primario bloqueado por preadsorción con su antígeno (ghrelin 10 µM), durante 24 horas a 4º C, u omitiendo algún paso esencial en la técnica.

Las muestras se analizaron y fotografiaron utilizando el microscopio Provis AX70 (Olympus, Tokio, Japón).

B) Determinación de expresión génica mediante RT-PCR

La técnica RT-PCR consta de dos pasos: a) el primero consiste en la transcripción reversa de todo el ARNm obtenido de las muestras de análisis con el objeto de sintetizar la secuencia de ADN complementaria (ADNc) al ARNm y b) el ADNc obtenido se utiliza en el segundo paso de la técnica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que el enzima ADN polimerasa termoestable amplifica una secuencia de ADN conocida. La unión al ADNc de un par de primers o cebadores marca el límite de la secuencia específica a amplificar. Tras la reacción se obtiene una gran cantidad de producto de estudio partiendo de una pequeña cantidad de muestra.

Extracción de ARN mensajero.

Para la obtención del ARNm, que posteriormente se utilizará para RT-PCR, se mantuvieron las células HL-1 en los platos de cultivo hasta que presentaron una confluencia celular de un 80-90 %. Para el análisis de la regulación de expresión de los genes de interés se realizaron los tratamientos específicos antes de la extracción.

Una vez que alcanzaron estas condiciones y realizado el ensayo, se retiró el medio de cultivo y realizó un lavado con PBS frío para eliminar los restos celulares que podrían interferir en la extracción.

Las células se disgregaron utilizando 1ml de Trizol-LS® (Life Technologies) y se siguieron las instrucciones que adjuntan el reactivo descritas a continuación:

1. añadir 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol-LS® utilizado para disgregar las células, agitar la mezcla durante 15 segundos y dejar reposar unos 2 o 3 minutos.
2. centrifugar las muestras a 12000g durante 15 minutos a 4º C, recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo, añadir a la fase acuosa 500 µl de alcohol isoamílico por cada ml de Trizol-LS® del paso 1, agitar las muestras y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

3. centrifugar las muestras a 12000g durante 10 minutos a 4º C para la precipitación del ARNm, eliminar el sobrenadante por decantación con cuidado de no despegar el pellet obtenido y añadir 500 µl de etanol 70% en agua DEPC frío, para lavar eliminar el exceso de alcohol isoamílico, y agitar las muestras.
4. centrifugar las muestras a 7500g durante 5 minutos a 4º C, eliminar el sobrenadante por decantación con cuidado de no despegar el pellet y dejar secar unos minutos a temperatura ambiente hasta que el precipitado se vuelva translúcido.
5. resuspender el ARNm en agua DEPC (Sigma).

En el paso siguiente se trataron las muestras durante 2-4 horas a 37º C de temperatura con 10 unidades de DNAse I (Life Technologies) (enzima que destruye los fragmentos de ADN) y 20 unidades de inhibidor enzimático de ribonucleasas RNAseOut (Life Technologies) por cada 5 µg de ARNm obtenido en la extracción, para evitar la presencia de contaminaciones con ADN genómico. Posteriormente se realizó una purificación mediante una extracción fenol, cloroformo-isoamilalcohol:

1. partiendo de un volumen de 200 µl de la muestra (ARNm tratado disuelto en agua DEPC) se añade un volumen igual de fenol, se agitan las muestras y centrifugan a 14000 rpm durante 4 minutos a 4º C.
2. se recupera la fase acuosa y se transfiere a un nuevo tubo, se añade un volumen igual al recuperado de cloroformo-isoamilalcohol en proporción 25:1:1, se agitan las muestras y centrifugan a 14000 rpm durante 4 minutos a 4º C.
3. se recupera nuevamente la fase acuosa y transfiere a un nuevo tubo, se añade un volumen igual al recuperado de cloroformo-isoamilalcohol en proporción 24:1, se agitan las muestras y centrifugan a 14000 rpm durante 4 minutos a 4º C.
4. se recupera la fase acuosa y transfiere a un nuevo tubo, se añaden dos volúmenes de etanol 96% frío (-20º C) y un volumen determinado de acetato sódico para obtener una concentración final de 3 mM.
5. se agitan la muestra y se deja precipitando el ARNm durante toda una noche en el congelador a -80º C.

6. se centrifuga la muestra a 14000 rpm durante 30 minutos, se elimina el sobrenadante y se deja secar el precipitado a temperatura ambiente hasta que éste se vuelva translúcido.
7. se resuspende en un volumen adecuado de agua DEPC.

El ARNm de corazón de humano se obtuvo a partir de muestras de donantes de corazón. El tejido se disgregó mecánicamente, mediante el uso de un homogeneizador y posterior extracción del ARNm, siguiendo el protocolo utilizado en la extracción de ARNm de las células HL-1, con Trizol-LS®. El ARN total se cuantificó en el espectrofotómetro (Beckman DU62) a una longitud de onda de 260 nm y analizando la relación 260/280 nm.

Reacción de retrotranscripción (RT)

La cuantificación de la expresión de los genes de interés en la línea cardiomiocitaria HL-1 y en muestras humanas se realizó mediante un análisis semicuantitativo por RT-PCR en las condiciones adecuadas. Se utilizaron para este análisis de 1,5 a 2 µg del ARNm total.

El ADNc complementario se sintetizó mediante la reacción enzimática que incluye los siguientes componentes (productos de Life Technologies):

- 200 U del enzima Moloney murine leukemia reverso transcriptasa (MMLV-RT)
- 6 µl de la mezcla de dNTPs (10 mM de cada nucleótido)
- 6 µl de la solución tampón para RT compuesta por 250 mM Tris-HCL pH 8.3, 375 mM KCL, 15 mM $MgCl_2$
- 1.5 µl de la solución de $MgCl_2$ 50 mM
- 0.17 µl de la solución de hexámeros aleatorios (3 µg/µl)
- 0.25 µl de ARNaseOut [Inhibidor recombinante de ribonucleasa 40 U/µl]

más el ARNm en un volumen total de reacción de 30 µl.

El control negativo de la RT se realizó con la mezcla sin la presencia del enzima reverso transcriptasa (MMLV).

Las condiciones de la reacción fueron: 37º C durante 50 minutos, 42º C durante 15', terminando la reacción a 95º C durante 5 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Del ADNc, obtenido en el proceso de retrotranscripción, se utilizaron 2 µl para su amplificación por PCR en un volumen de 30 µl de reacción compuesta por (productos de Life Technologies):

- 3 µl de tampón de PCR (10x)
- 2.4 µl de la mezcla de dNTPs (10mM de cada nucleótido)
- 30 ng/µl de cada primers del gen de interés (especificados en la Tabla 1)
- 0.75 U del enzima Taq ADN polimerasa

El perfil de amplificación, compuesto por la fase de desnaturalización, alineación y extensión, al igual que el número de ciclos de amplificación con un paso final de extensión, es específico para cada gen (Tabla 1).

Como control interno, para la calidad del ARNm utilizado en los ensayos, se amplificó el gen para el enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se realizaron los controles positivos de las especies utilizadas, y los consecuentes controles negativos de la reacción.

Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa concentrado al 2%, teñido con bromuro de etidio, que se intercala entre el material amplificado y permite analizar el ADNc mediante el Scanner System TYPHOON 9410 (Amersham).

C) Southern blot

El gel que se obtuvo en la electroforesis se prepara para la transferencia en dos pasos; primero desnaturalizando el ADN con una solución compuesta por NaOH 0.5 M/ NaCl 1.5 M durante 30 minutos en agitación, y un segundo paso donde se neutraliza el ADN mediante una solución 0.5 M Tris-HCl / 1.5 M NaCl a pH 8.0. Se transfirieron las muestras amplificadas desde el gel de agarosa a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) mediante un gradiente de concentración de sales (solución citrato salina estándar: SSC 20X; 3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico a pH 7.2) y capilaridad toda la noche a temperatura ambiente. La membrana se expuso durante 10 minutos a rayos ultravioleta para la fijación de los productos transferidos. A continuación se bloqueó la membrana, para evitar una hibridación inespecífica de la sonda, con la solución de

prehibridación, compuesta por cada ml de solución: 0.1 g de sulfato de dextrano, 200 µl agua DEPC; 200 µl Denhart´s 50x (1% Ficoll, 1% BSA y 1% de polovinilpirrolidona), 10 µl SDS 10%; 500 µl formamida desionizada; 1 mg pirofosfato sódico, 58 mg NaCl y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón (previamente desnaturalizado durante 10 minutos a 96º C). La prehibridación se realizó durante 24 horas a 44º C en agitación en un horno de hibridación (Amersham). La hibridación de la membrana se llevó a cabo con una sonda antisentido específica para ghrelin de rata marcada con α^{32}P-dCTP (3000Ci/mmol) (Amersham), y previamente incubada a 96º C durante 10 minutos. La sonda fue donada generosamente por el Doctor Carlos Diéguez (Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela).

Tras 18 horas de hibridación a 44º C y en agitación, se eliminó el exceso de sonda marcada, lavando abundantemente de la siguiente forma:

a) dos lavados de 5 minutos con SSC 2X a temperatura ambiente

b) dos lavados de 30 minutos con SSC 2X, 0.5% SDS a 65º C y

c) dos lavados de 30 minutos con SSC 0.1%, a temperatura ambiente.

Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente, y seguidamente se procedió a la exposición de la membrana a radiografía en un cassette de revelado a -80º C. El análisis de las bandas se determinó examinando la imagen obtenida en la electroforesis y comparando los pesos específicos de cada banda con el marcador de peso molecular de 100 pb.

D) Secuenciación

Mediante la técnica de secuenciación confirmamos que el producto obtenido en el proceso de RT-PCR es realmente el GHS-R.

El producto de PCR, en el que nos aseguramos la presencia de una única banda de expresión mediante el análisis de electroforesis en gel de agarosa concentrado al 2% teñido con bromuro de etidio, se purificó empleando las enzimas ExoSAP-IT (1 unidad de cada enzima). A continuación, las muestras se incubaron en un termociclador en dos pasos: un primer ciclo de 30 minutos a una temperatura de 37º C, y un segundo ciclo de incubación a 80º C durante 15 min.

Tras la purificación se realizó la mezcla de amplificación con los siguientes productos:

- 2,5 µl de la muestra de PCR tratada con las enzimas (TEMPLATE)
- 3 pM del primer sentido o antisentido utilizados en la PCR
- 2 µl PREMIX (BIGDye^{TM} Terminador Kit; Amersham Bioscience)

Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 4 minutos a 96º C, 30 ciclos de 15 segundos a 96º C; 10 segundos a 50º C y 3 minutos a 60º C.

El producto de amplificación obtenido sigue un segundo proceso de purificación en el que se utilizan 5 µl del producto de cada muestra, y a los que se añaden 31.25 µl de etanol absoluto (frío –20º C), 3 µl de acetato sódico 3 M y 7,25 µl de agua estéril.

- se deja reposar la mezcla durante 15 minutos y posteriormente se centrifuga a 4º C, 14000 rpm durante 20 minutos.
- se retira el sobrenadante y resuspende el precipitado en 50 µl de etanol al 70% frío (-20º C).
- se centrifuga nuevamente durante 6 minutos a 14000 rpm.
- se retira el sobrenadante y se deja secar durante 30 minutos a 47º C en el termociclador con la tapa de los tubos abierta.
- un vez seco, el precipitado se resuspende en 10 µl de formamida (Applied) y se carga la muestra en el secuenciador (3100 Avant Genetic Analyzer ABI PRISM, Applied).

E) Estudio de unión ligando-receptor

El estudio de unión ligando-receptor (binding) permite la determinación de propiedades cinéticas de afinidad y de equilibrio de esta unión, además de permitir estimar la densidad de los receptores en un tipo celular determinado. Para ello, se realiza una doble incubación de las muestras en presencia del ligando marcado con radiactividad, a una cantidad conocida y constante, y el ligando frío (sin marcaje) a concentraciones crecientes. El análisis del ensayo resulta del desplazamiento de la unión de la hormona marcada al ligando por la hormona fría cuando la reacción alcanza el equilibrio.

Receptor + Ligando $\longleftrightarrow$ **Ligando - Receptor**

El análisis se realizó en las células HL-1 para el estudio de los receptores GHS-R y GPR39 en estas células. Se sembraron entre 450000-500000 células por pocillo. Una vez que las células estuvieron adheridas al plato se deprivaron de suero durante 12 horas. Tras este tiempo, se añadieron los tratamientos de hormona marcada radiactivamente (ghrelin u obestatina) y hormona fría (sin marcaje).

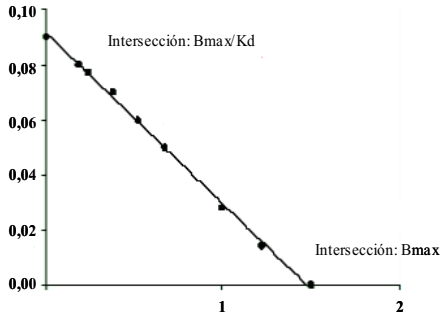
Puntos de análisis para el estudio de GHS-R:

- Total: contiene 110-120000 cpm/ml ghrelin ^{125}I (Amersham) NSB (unión no específica): contiene la combinación de ghrelin ^{125}I y ghrelin frío (4 µg/ml).
- Dosis crecientes de hormona fría (ghrelin): 1, 2, 7.5, 10, 40, 75, 100 ng/ml.

Puntos de análisis para el estudio de GPR39:

- Total: contiene 110-120000 cpm/ml obestatina ^{125}I (Phoenix) NSB (unión no específica): contiene la combinación de obestatina ^{125}I y obestatina (4 µg/ml).
- Dosis crecientes de hormona fría (ghrelin): 1, 10, 100, 1000 ng/ml.

La incubación de los tratamientos se realizó en una solución de PBS y 0.5% de BSA durante 16-18 horas a 4º C. Tras dos lavados con PBS frío las células se disgregaron con 1 ml de NaOH 1N durante 10-15 minutos. Seguidamente, las muestras se transfirieron a tubos de RIA y se realizó la lectura del total de la radiactividad asociada en un γ-COUNTER (^{125}I). Los datos obtenidos se analizaron mediante un software estadístico, calculando la constante de disociación del ensayo (Kd) y el número máximo de sitios de unión (Bmax).



Representación gráfica del análisis Scatchard

El análisis Scatchard se realizó utilizando el programa informático Ligand (Munson y Rodbard, 1980).

F) Medida calcio intracelular

La medida del calcio intracelular en tiempo real se llevó a cabo en células en suspensión, utilizando el compuesto fura 2 penta-acetoximetiléster (fura 2 A/M) (Sigma) como sonda de calcio selectiva. Se estudió la movilización de calcio intracelular en la línea cardiomiocitaria HL-1 y como control positivo se utilizaron células de riñón embrionario humano, HEK-293, transfectadas de forma estable con GHS-R1a, donadas generosamente por el Doctor Felipe Casanueva (Departamento Endocrinología, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela).

Las células HL-1 se crecieron en placas petri de 100 mm a una confluencia del 75-80%, se tripsinizaron, se centrifugaron durante 5 minutos 1500 rpm y resuspendieron en 0.5 ml de tampón Krebs-Ringer-Hepes (KRH compuesto por: NaCl 125 mM, KCl 5 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $CaCl_2$ 2 mM, glucosa 6 mM y HEPES 25 mM pH 7.4) por cada placa petri utilizada. Una vez resuspendidas las células se incubaron con fura 2 A/M, concentración final de 3 μM, durante 30 minutos a 37º C con agitación constante. Posteriormente, se centrifugaron las células y retiró el sobrenadante eliminado el exceso de fura 2 A/M. Una vez resuspendidas, las células se diluyeron en proporción 1:4 en KRH y se mantuvieron a temperatura ambiente. La medida de calcio intracelular se realizó en una cubeta termostatizada (37±1º C), bajo agitación magnética constante, en el fluorímetro LS-50B (Perkin-Elmer, Boston, MA) ajustado a las longitudes de onda 345 nm (excitación) y 490 nm (emisión).

La movilización de calcio se analizó mediante la lectura, en proporción relativa, utilizando diferentes longitudes de onda (345, 380 y 490 nm).

En un primer momento, se hizo la lectura de la fluorescencia basal e inmediatamente después se añadió el estímulo en la cubeta del fluorímetro en donde están las células en análisis. Se registró la señal durante un período de dos minutos, dejando estabilizar la señal, y después de ese período se añadió ácido lisofosfatídico (LPA; 2,3 μM), que provoca un incremento transitorio de la concentración de calcio intracelular, como control positivo. Posteriormente, se calibró el fluorímetro en tres pasos: en un primer paso se añade en la cubeta del fluorímetro EGTA, a una concentración final de 30mM, como agente quelante del calcio extracelular. A continuación, se añade una solución de Triton X-100 (0.1% final) para provocar la lisis celular, liberándose la sonda de fura 2 que pudiese permanecer intracelularmente. Por último, se añade $CaCl_2$ (4 mM, final), favoreciendo la saturación del indicador,

registrándose la fluorescencia máxima; preparando así el fluorímetro para la siguiente medida.

G) Radioinmunoensayo

Los niveles de secreción de ghrelin al medio de cultivo de las células HL-1 y del cultivo primario de cardiomiocitos humanos se analizaron siguiendo las instrucciones de uso de un kit de radioinmunoensayo (RIA) (Phoenix). Tras 24 horas de serodeprivación de las células HL-1 en ExCell A+B y DMEM para los cardiomiocitos humanos, se recuperaron los medios de cultivo y centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a 4º C, para eliminar restos celulares en suspensión y así determinar la concentración de ghrelin en el medio de cultivo.

El proceso de radioinmunoensayo se realiza durante tres etapas con los siguientes pasos:

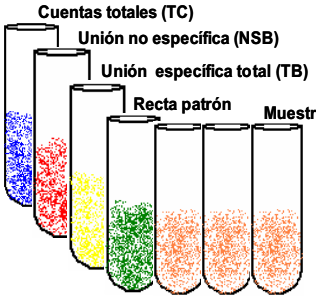
a. En la primera etapa se resuspende el tampón de ensayo con 150 ml de agua destilada para posteriormente utilizarlo como medio de disolución de los demás reactivos del Kit del RIA.

    - El vial de ghrelin sintético para realizar la recta patrón.
    - El anticuerpo primario específico para ghrelin (generado en conejo).
    - El vial de ghrelin marcado con ^{125}I.
    - El anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario de conejo.
    - Suero normal de conejo.

b. El límite de detección del kit está entre 10 pg y 1280 pg por tubo, y la recta patrón está formada por los siguientes puntos:

10 pg/ml	20 pg/ml	40 pg/mg	80 pg/mg	160 pg/ml	320 pg/ml	640 pg/mg	1280 pg/ml

c. Se realizaron las mezclas, como se indica en el siguiente esquema, siempre realizando cada punto por duplicado.



	Tampón	[ ] ghrelin/ medio de cultivo	Anticuerpo α- ghrelin	ghrelin [I-^{125}]
TC				100µl
NSB	200µl			100µl
TB	100µl		100µl	100µl
Recta patrón		100µl [ ] ghrelin	100µl	100µl
Muestras		100µl medio cultivo	100µl	100µl

Representación gráfica de la primera etapa y segunda etapa del RIA.

d. agitamos las muestras y se dejan incubar entre 16 y 24 horas a 4º C.
e. en la segunda etapa añadimos, a cada uno del los tubos del RIA, el péptido ghrelin marcado radiactivamente, aproximadamente 8000-10000 cpm/ cada 100 µl.
f. agitamos nuevamente los tubos y dejamos incubar otras 16-24 horas a 4º C.
g. por último, en la tercera etapa se añaden 100 µl de anticuerpo secuandario y 100 µl del suero de conejo a todos los tubos de ensayo exceptuando los tubos TC que se apartan del ensayo, hasta el punto de cuantificación.
h. agitamos los tubos y dejamos incubar a temperatura ambiente durante una hora y media.
i. trascurrido este período de tiempo, se añaden 500 µl de tampón y se centrifugan los tubos a 3000 rpm durante 20 minutos y 4º C de temperatura.
j. aspiramos el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el precipitado obtenido en la centrifugación.
k. cuantificamos la radiactividad de todos los tubos incluyendo en este paso los TC en el contador γ.
l. la determinación de la concentración de ghrelin en el medio de cultivo se obtuvo a través del software del contador γ. Este software determinó gráficamente puntos de unión específica y unión no específica, además de la concentración de la recta patrón utilizada para extrapolar la radiactividad obtenida a la cantidad de ghrelin (pg/ml) presentes en las muestras.

H) Ensayos de actividad metabólica (MTT)

El ensayo MTT analiza la actividad metabólica de las células viables dentro del cultivo. El ensayo se realiza utilizando el compuesto MTT, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma), que es metabolizado por enzimas deshidrogenasas mitocondriales, dando lugar a la formación de una sal que presenta un grupo diazónico. Esta sal absorbe la luz a una longitud de onda de 550 nm detectable mediante un lector de ELISA (Multiskan Ex; Thermolabsystems).

La metabolización del compuesto MTT depende de la actividad redox de la célula y es reflejo de la función mitocondrial por lo que se utiliza como indicador del estado metabólico de la célula (Hynes y col., 2005). Se emplea además como medida indirecta de la viabilidad o proliferación celular (Takahashi y col., 2002).

El análisis se realizó sembrando las células en placas de 96 pocillos. Las células se deprivaron de suero durante 12 horas y posteriormente se estimularon con los tratamientos adecuados. Cuatro horas antes de que se cumpliese el tiempo del tratamiento se añadió el compuesto MTT, a una concentración final de 0.5 mg/ml, y se dejaron las células a 37º C. Tras estas cuatro horas se añadieron 100 µl de una solución SDS 10% y 0.01% de ácido clorhídrico, como agente solubilizante, que detiene la reacción enzimática. La placa se incubó durante toda la noche a 37º C, 5% de CO_2, 95% aire y 95% humedad relativa, y 12 horas después se realizó la lectura en el lector de ELISA a una longitud de onda de 550 nm. La absorbancia se correlacionó directamente con la actividad metabólica de las células.

I) Citometría de flujo

Para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo se sembraron 500000 células en flask de 25 cm^2. Tras 12 horas de serodeprivación se realizó el tratamiento con obestatina.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se despegaron utilizando tripsina-EDTA, se centrifugaron y se recogieron en 10 ml de medio DMEM con 10% de FBS, y se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos. A continuación, el precipitado se disgregó y lavó en 1ml de tampón PBS, y las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 5 minutos. Una vez fijadas se incubaron toda la noche en etanol al 70% frío

a -20º C. Tras esta incubación las células se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos, se descartó el sobrenadante, y se resuspendieron en 1ml de tampón PBS con 1 mg/ml de ARNasa y 40 µg/ml de ioduro de propidio, y se dejó incubando 1 hora. El ioduro de propidio se intercala entre el ADN, lo que permite determinar la cantidad y calidad del ADN presente en la célula, además de clasificar las fases del ciclo celular. Tras la incubación, la suspensión celular se analizó por citometría de flujo en un FACSCALIBUR (BD), utilizando el programa de análisis Cell Quest.

J) Tinción vital Hoechst 33258

La tinción vital Hoechst 33258 (Sigma), basada en la diferente coloración nuclear de las células en cultivo, pone en evidencia la presencia de células que han entrado en fase de apoptosis. Esta técnica utiliza el agente colorante bisbenzidina, que se introduce en el ADN entre las bases Adenina-Timina.

Así, una vez que se realiza la tinción y se analiza el resultado en un microscopio de fluorescencia, podemos diferenciar dos poblaciones celulares por el color de sus núcleos: una que presenta un color azul apagado y uniforme en los núcleos, correspondiente con las células viables; y otra con los núcleos de color azul intenso brillante y distribuido de forma granular debido a la condensación de la cromatina, que caracteriza las células en apoptosis.

El procedimiento seguido para la tinción Hoechst 33258 fue el siguiente:

Una vez que las células sembradas en placas de 24 pocillos (10000 células por pocillo) se trataron durante el tiempo y dosis correspondientes se realizó la tinción nuclear. En primer lugar se retiró parte del medio de cultivo y se añadió el componente de la tinción a una concentración final de 5 mM, y una solución tampón, HEPES pH 7.8, a una concentración final de 20 mM. Las células se incubaron durante 45 minutos a 37º C, 5% de CO_2, 95% aire y 95% humedad relativa. A continuación, se realizaron dos lavados con tampón PBS para eliminar el exceso de colorante. Las células se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% en PBS, durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se realizó el análisis mediante recuento celular en un microscopio de fluorescencia Olympus X-FLA (Olympus Optical, Hamburg, Alemania).

K) Ensayos de captación de ácidos grasos

El ensayo de captación de ácidos grasos, o su denominación comercial BODIPY® (Boron dipyrromethene) (Sigma), nos permite medir la capacidad que presentan las células de incorporar o captar ácidos grasos de cadena larga. El ensayo se basa en la incubación con un ácido graso de cadena larga marcado con fluorescencia (FITC), y posterior análisis de esa fluorescencia mediante citometría de flujo.

Para el ensayo se realizó una siembra de 250000 células HL-1/pocillo, en placas de cultivo de 6 pocillos. Una vez estabilizadas y a la confluencia deseada, la células se deprivaron de suero durante 16 horas en medio A+B. Se trataron las células, en medio A+B, con los puntos de ensayo detallados en el apartado de tratamientos celulares. Tras el tratamiento, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente, incubándose luego con el medio de captación de lípidos compuesto por 10 μM Bodipy-FITC y 20 μM de BSA libre de ácidos grasos en PBS durante 30 segundos. Se lavaron 3 veces con PBS-0.1% BSA libre de ácidos grasos, eliminando así el exceso de Bodipy-FITC. Las células se despegaron de los pocillos con tripsina-EDTA, y se inactivó la tripsina con 500 μl PBS a 4º C. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante cinco minutos a cuatro grados. Se precipitado de células obtenido se resuspendió en 2ml de PBS frío con ioduro de propidio (1μM) y se incubaron durante 15 minutos en oscuridad. El marcaje con ioduro de pripidio nos permite analizar el porcentaje de células muertas durante el procesado de las muestras.

La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo (FASCalibur), en donde obtuvimos una visión de la fluorescencia de la población de células determinando la mayor o menor captación del lípido en comparación con las células sin tratamiento.

L) Ensayos de captación de glucosa

El ensayo de incorporación de glucosa analiza la capacidad de las células de incorporar glucosa a través del citoplasma para posteriormente ser metabolizada.

Para la realización de este ensayo se realizó una siembra de 90000 células/ pocillo en una placa de cultivo de 24 pocillos. Una vez estabilizadas las células, tras un día de cultivo, se serodeprivaron durante 16 horas en medio A+B. Tras realizar los tratamientos, se hicieron dos lavados con 250 μl de solución tampón HEPES salino (HSB pH: 7,4) a temperatura ambiente. Se incubaron durante 30 minutos con la

solución de incorporación de glucosa (SIG) compuesta por HSB y glucosa fría, a una concentración final de 10 μM, y el volumen de glucosa marcada con tritio (2-deoxi-D-[^{3}H]glucosa; Amersham) adecuado que aportaba 500000 cuentas por minuto/pocillo.

Como control negativo de incorporación de glucosa se realizó el tratamiento con el inhibidor de la captación de glucosa cytochalasin B a la dosis de 10 μM. Tras los 30 minutos de incubación, se retiró el exceso de 2-deoxi-D-[^{3}H]glucosa realizando 3 lavados de 500 μl con NaCl 0.9% a 4º C.

Para la cuantificación de la incorporación de glucosa se lisaron las células añadiendo a cada pocillo 500 μl de solución NaOH 0.05 N. Un volumen de 450 μl del lisado de las células se transfirió a un tubo de cuantificación al que se le añadieron 2 volúmenes de líquido de centelleo. El volumen restante, 50 μl, se conservó para la posterior cuantificación de la concentración proteica de cada pocillo. La cuantificación de la 2-deoxi-D-[^{3}H]glucosa se realizó en un contador β; Wallac 1414 WinSpectral v.140 S/N 4140376, que cuantifica las cpm de 2-deoxi-D-[^{3}H]glucosa incorporadas en cada punto del ensayo.

La cuantificación proteica se realizó mediante el método de Lowry, utilizando el kit de Protein Assay (Bio-Rad) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se realizó una recta de cuantificación con concentraciones proteicas conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

Rango de concentración de BSA:

- 0 mg/ml; 0.2 mg/ml; 0.4 mg/ml; 0.6 mg/ml; 0.8 mg/ml; 1 mg/ml

Se añadieron 50 μl de solución A y 400 μl solución B (Kit Protein Assay), por cada 10 μl de las muestras. El conjunto se incubó durante 15 minutos y trascurrido este tiempo se realizó la lectura de absorbancia a 750 nm espectrofotómetro (Beckman DU62).

El resultado final del análisis de incorporación de glucosa se refirió como la molaridad de 2-deoxi-D-[^{3}H]glucosa de cada punto del ensayo con respecto a la concentración proteica y al tiempo de exposición de la 2-deoxi-D-[^{3}H]glucosa en competición con la glucosa fría.

Incorporación de glucosa = pM 2-deoxi-D-[^{3}H]glucosa /mg proteína/30minutos

M) Western blot

Se sembraron 450000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Una vez estabilizadas las células se serodeprivaron durante 12 horas en medio A+B y tras este tiempo se realizaron los tratamientos celulares. Los tratamientos se finalizaban pasando la placa a hielo y lavando las células dos veces con tampón PBS frío.

Para obtener el extracto total de proteínas se lisaron las células con 75-100 µl de solución de lisis compuesta por 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, 1 mM $NaVO_4$, 250 mM NaF, 30 mM pirofosfato sódico, 10 µg/ml aprotinina, y 10 µg/ml leupeptina. Las células se disgregaron utilizando un raspador de células y pasando cada muestra a través de la punta de pipeta varias veces antes de transferirlas a tubos, donde se dejaron incubando durante 20 minutos en hielo. Tras la incubación, centrifugamos las muestras a 14000 rpm durante 20 minutos a 4º C. Se recuperó el sobrenadante, donde se encuentra el extracto proteico, y se cuantificó la concentración de proteína obtenida durante el proceso de lisado.

Para la cuantificación utilizamos un método colorimétrico de Bradford. Se realizó una recta estándar con concentraciones conocidas a partir del stock 1 mg/ml de la proteína BSA que al reaccionar con el reactivo de Bradford adquiere diferentes grados de coloración. Se analizó la lectura de la absorbancia de estos puntos estándar en el espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda. Con los datos de concentración y absorbancia se realizó una recta de regresión que nos permitió determinar la concentración proteica de las muestras.

La recta se configuró con las siguientes concentraciones de BSA por ml de reactivo de BioRad 1X:

- 0 µg/ml; 0.5 µg/ml; 1 µg/ml; 2.5 µg; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml; 20 µg/ml.

El análisis de las muestras se realizó cuantificando 2 µl de cada una de ellas por separado en 998µl del reactivo Bradford. La lectura de absorbancia se hizo a 595nm y los resultados obtenidos se extrapolaron en la recta de regresión estándar, con lo que determinamos la concentración proteica de cada muestra. Tras la cuantificación, las muestras se prepararon para ser cargadas en el gel de electroforesis. Las muestras (40-50 µg de proteína) se mezclaron en igual proporción con tampón de carga compuesto por: glicerol, azul de bromofenol y β-mercaptoetanol, y se hirvieron durante 5 minutos a

100º C para desnaturalizar las proteínas. El tampón de carga confiere peso a la muestra además de formar el "frente de electroforesis" y facilitar el seguimiento del avance de las muestras durante este proceso.

La proteína se separó mediante el proceso de electroforesis vertical en un gel de acrilamida al 10% compuesto por dos fases. La fase superior ("o stacking") permite la concentración de las muestras antes de entrar en la fase inferior (o "resolving"), por lo que facilita la homogeneización del frente de electroforesis. Esta fase se preparó con los siguientes reactivos: acrilamida, 1 M Tris-HCl, pH 6.8; 10% SDS, 10%; persulfato amónico; TEMED (BioRad) y agua destilada. La fase inferior es el gel de resolución de la proteína en donde éstas se separan en función de su peso molecular. El gel de resolución se compone de acrilamida; Tris 1.5 M, pH 8.8; SDS 10%; persulfato amónico 10%; TEMED y agua destilada.

La electroforesis se realizó durante una hora y media a voltaje constante (90v). Mientras se desarrolló la electroforesis se preparó la membrana de PVDF (Hybond, Amersham), para la posterior transferencia de las proteínas, de la siguiente forma:

- se hidrató la membrana de PVDF durante 1 minuto en metanol
- posteriormente en agua destilada durante 5 minutos
- y por último se pasó a la solución de transferencia hasta la realización de la transferencia.

La transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF se realizó durante una hora a amperaje constante (0.28A). Una vez completada la transferencia, la membrana se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante con tampón TBS-T (compuesto por: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0.1% Tween 20) y 5% de leche en polvo desnatada. La incubación con el anticuerpo primario, que reconoce la proteína de interés en el estudio de Western blot, se realizó diluyendo el anticuerpo en TBS-T-5% leche e incubando la membrana durante toda la noche a 4º C en agitación constante. El siguiente paso realizado fue eliminar el exceso de anticuerpo no adherido a la membrana mediante un lavado con TBS-T durante 30 minutos en agitación constante. Seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario, el cual se une específicamente al primario, diluido en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Este anticuerpo secundario está conjugado con el enzima peroxidasa y al añadirle su sustrato lo metaboliza emitiendo una señal detectable con el uso de autorradiografía.

Anticuerpo primario	*Dilución*
α-pAkt (Cell signaling)	1:1000
α-Akt (Cell signaling)	1:1000
α-PTEN (Santa Cruz)	1:1000
α-β actina (Sigma)	1:2000

Antes del proceso de revelado se eliminó el exceso de anticuerpo secundario lavando la membrana durante 30 minutos en tampón TBS-T, en agitación constante y a temperatura ambiente.

El revelado de la membrana se realizó incubando la membrana con el reactivo ECL (Amersham), sustrato de la peroxidasa, siguiendo las proporciones indicadas por el fabricante (5 minutos a temperatura ambiente y sin agitación). Tras este tiempo, la membrana se transfirió a un cassette de autorradiografía y se revelaron las placas radiográficas en una máquina reveladora (Agfa) del Servicio de Radiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Para la comprobación de que los resultados obtenidos, en cuanto a la determinación proteica por Western blot, se deben a los tratamientos realizados es necesaria una normalización de estos resultados con la carga real de las muestras. Existen dos formas de realizar la normalización de la carga. Cuando se analizan proteínas que presentan cambios funcionales por fosforilación, la normalización de estos cambios se realiza analizando los niveles proteicos de la proteína total. Por otra parte, cuando la proteína que nos interesa no sufre cambios conformacionales sino que lo que varían son sus niveles de expresión proteica se normalizan estos cambios con la detección de una proteína que no presenta cambios en sus niveles de expresión a pesar de los tratamientos, un ejemplo de estas proteínas de análisis es generalmente la β-actina.

Para ello, en primer lugar se elimina el complejo formado por el anticuerpo primario y secundario de la membrana revelada, lavando la membrana con un tampón compuesto por Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 10%, 100 mM β-mercaptoetanol, durante 30 minutos en un baño con agitación a 55º C. Posteriormente se lavó la membrana en TBS-T durante otros 30 minutos, tras los cuales la membrana se bloqueó y se realizaron los siguientes pasos detallados con anterioridad hasta revelar de nuevo la membrana.

La cuantificación de los resultados obtenidos se realizó mediante la densitometría de las bandas de cada proteína de interés. Para ellos se utilizó el escáner Typhoon 9410 Documentation System y el software de densitometría (Amersham).

N) Análisis estadístico

Los datos obtenidos se presentan como valores medios ± SEM (error estándar de la media) de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el estadístico ANOVA seguido de un test Student-Newman-Keuls. Un valor de $p<0.05$ se consideró como significativo.

Tabla 1. Característica de los cebadores utilizados en la técnica de RT-PCR

Producto	Secuencia de primers		Tamaño de amplificación	Condiciones amplificación
Prepro-ghrelin Ratón (Mori y col., 2000)	*P. sentido*	*5'*-**AGCATGCTCTGGATGGACATG**-*3'*	329 pb	36 ciclos (98º C/20''; 63º C/1'; 72º C/1') extensión 10'/72º C
	P. antisentido	*5'*-**AGGCCTGTCCGTGGTTACTTGT**-*3'*		
Ghrelin Humano (Gualillo y col., 2001)	*P. sentido*	*5'*-**TGAGCCCTGAACACCAGAGAG**-*3'*	323 pb	36 ciclos (98º C/20''; 58º C/1'; 72º C/1') extensión 10'/72º C
	P. antisentido	5'-**AAAGCCAGATGAGCGCTTCTA** *-3'*		
GHS-R ratón (Genebank, AF332997)	*P. sentido*	*5'*-**CTATCCAGCATGGCCTTCTC** *-3'*	199 pb	36 ciclos (98º C/20''; 63º C/1'; 72º C/1') extensión 10'/72º C
	P. antisentido	*5'*-**GGAAGCAGATGGCGAAGTAG** *-3'*		
GHS-R1a Humano (Jeffery y col.,2002)	*P. sentido*	*5'*- **TCTTCCTTCCTGTCTTCTGTC** *-3'*	349 pb	36 ciclos (98º C/20''; 50º C/1'; 72º C/1') extensión 10'/72º C
	P. antisentido	*5'*- **AGTCTGAACACTGCCACC**-*3'*		
GPR39 ratón/rata (Genebank, BC085285)	*P. sentido*	*5'*- **TCATCGATCACAGCCATGT** *-3'*	190 pb	37 ciclos (94º C/1'; 60º C/1'; 72º C/1') extensión 10'/72º C
	P. antisentido	*5'*- **AAGCCAAACTGACCATGT** *-3'*		
GPR39 humano (Genebank, NM001508)	*P. sentido*	*5'*- **AGGTGCTGCAGAAGAAAGG** *-3'*	184 pb	37 ciclos (94º C/1'; 60º C/1'; 72º C/1') extensión 10'/72º C
	P. antisentido	*5'*-**GCCTCGAAGAGGAAAGTGT** *-3'*		
GAPDH (González-Juanatey y col., 2004)	*P.* sentido	5'- **CATGACAACTTTGGCATCGTGG**-*3'*	399 pb	26 ciclos
	P. antisentido	5'-**GTTGCT GTTGAAGTCACAGGAGAC**-*3'*		

Resultados

Ghrelin, des-acil ghrelin y GHS-R.

1. Expresión de ghrelin en cardiomiocitos

La expresión de ghrelin en la línea cardiomiocitaria HL-1 y en cardiomiocitos humanos se analizó mediante la técnica RT-PCR. Se utilizaron cebadores específicos para la secuencia prepro-ghrelin de ratón para la línea HL-1, y para la secuencia de ghrelin humano en el cultivo primario de cardiomiocitos auriculares de pacientes. El producto de PCR obtenido en la línea HL-l fue un fragmento de 329 pb, que se corresponde con el tamaño esperado según la secuencia del gen de prepro-ghrelin de ratón. La calidad del ARNm extraído de las células se verificó amplificando el gen que codifica para GAPDH. El producto obtenido para la amplificación de GAPDH fue de 399 pb. Como control positivo de la expresión de prepro-ghrelin se amplificó ARNm de estómago de ratón **(Fig. 1A).**

Para confirmar que el producto obtenido mediante RT-PCR era ghrelin se realizó una hibridación por Southern blot, con una sonda específica para ghrelin (**Fig. 1A**, panel inferior).

El análisis de la expresión de ghrelin, además de en cardiomiocitos humanos, también se realizó en endocardio y miocardio humano. El fragmento amplificado fue de 264 pb en todas las muestras de tejido analizadas. Como control positivo de expresión de ghrelin se utilizó ARNm extraído de estómago humano. De igual forma que en el análisis anterior, la calidad del ARN analizado se verificó con la amplificación del gen GAPDH (**Fig. 1B.1**). Tanto el tejido cardíaco, como los cardiomiocitos en cultivo, presentan unos niveles de expresión de ghrelin inferiores a los presentes en estómago (**Fig. 1B.2**).

En todas las reacciones de RT-PCR se realizaron los correspondientes controles negativos de expresión (véase pie de **figura 1**).

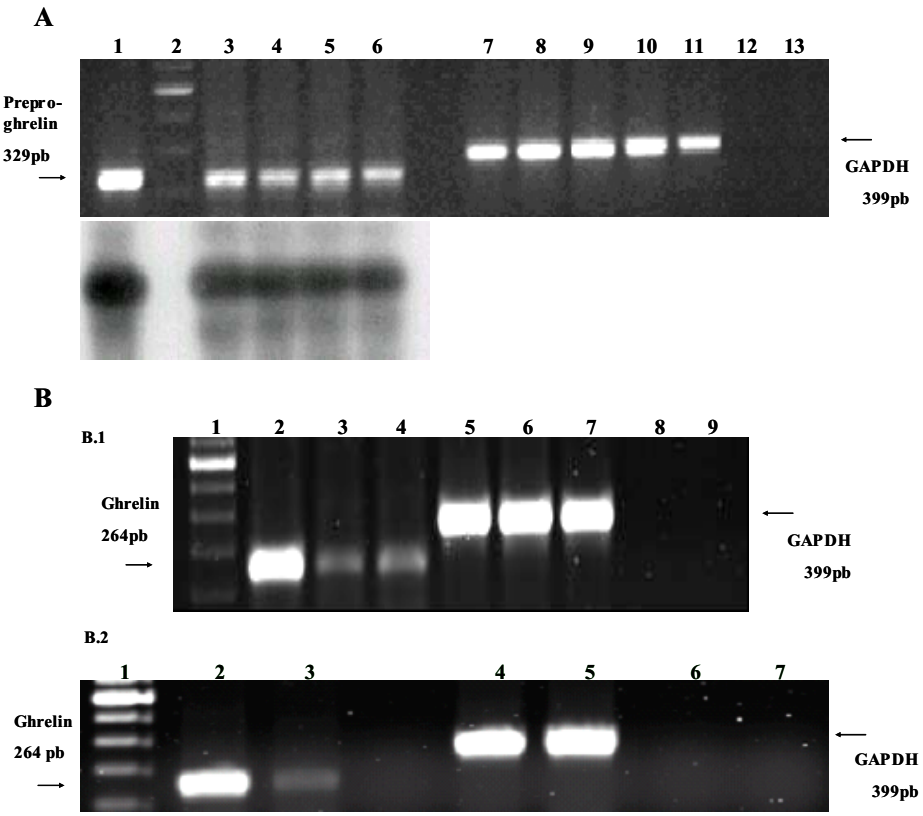


Figura 1. Análisis de la expresión génica de ghrelin en cardiomiocitos.

Panel A. Superior: Resultados de RT-PCR de la expresión de prepro-ghrelin en la línea celular HL-1 (calles 3-6). Como control positivo de expresión de prepro-ghrelin amplificamos ARNm de estómago de ratón (calle 1). Amplificación del gen para GAPDH como control de calidad del ARN utilizado: calles 7-11. Controles negativos de la reacción: calles 12 y 13. Inferior: Autoradiografía del Southern blot realizado con una sonda específica de ADNc para ghrelin.

Panel B. B.1. Resultados de RT-PCR de la expresión de ghrelin en tejido cardíaco humano (B.1) y cardiomiocitos humanos aislados (B.2). Se amplificó ghrelin en endocardio (calle 3, B.1), miocardio (calle 4, B.1) y cardiomiocitos aislados (calle 3, B.2). Como control positivo de expresión se amplificó ARNm de estómago humano (calle 1, B.1 y calle 2, B.2). Amplificación del gen para GAPDH como control interno: calles 5-7, B.1 y calles 4-5, B.2. Controles negativos de la reacción: calles 8-9, B.1 y calles 6-7, B.2.

2. Síntesis de ghrelin en cardiomiocitos

Una vez determinada la expresión génica de ghrelin, se analizó su posible síntesis proteica mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Para la determinación proteica de ghrelin se utilizó un anticuerpo policlonal α-ghrelin que reconoce la región interna del péptido, por lo que se determinó la presencia de ghrelin "total" (ghrelin y Des-G).

Como resultado de la técnica, detectamos la presencia citoplasmática de ghrelin en la línea cardiomiocitaria HL-1 (**Fig. 2A)** y en el cultivo primario de cardiomiocitos humanos (**Fig. 3A)**.

El cultivo de cardiomiocitos humanos se caracterizó usando el anticuerpo α-MHC, que reconoce la secuencia peptídica cercana a la región carboxi-terminal de la cadena pesada de la miosina. El objetivo era verificar que las células inmunorreactivas para ghrelin eran realmente cardiomiocitos, descartando la posible contaminación por parte de fibroblastos al realizar el cultivo primario de la orejuela (**Fig. 3B)**.

Las secciones histológicas de corazón de ratón y humano mostraron también inmunorreactividad citoplasmática frente a ghrelin (**Fig. 2E y 3F)**.

En los controles positivos utilizados (estómago de ratón y humano) se observan diversas células neuroendocrinas con una fuerte positividad, pertenecientes a la glándula oxíntica (**Fig. 2C y 3D)**.

Los controles negativos se realizaron con la preadsorción del anticuerpo específico para ghrelin con su antígeno homologo (**Fig. 2B-D y F y 3C-E y G)**.

3. Secreción de ghrelin por cardiomiocitos

Se analizó la capacidad de secreción de ghrelin por parte de cardiomiocitos mediante radioinmunoensayo (RIA). El anticuerpo utilizado en el RIA reconoce tanto la forma acilada como la desacilada de ghrelin. Las células HL-1 y los cardiomiocitos humanos en cultivo son capaces de secretar ghrelin al medio de cultivo. Las concentraciones de ghrelin medidas en el medio de cultivo de las células HL-1, después de 24 horas de serodeprivación, fueron 16.4± 0.3 pg/ml (n=3). La cantidad obtenida en el medio de cultivo del cultivo primario de cardiomiocitos humanos fue de 12.8 ± 1.1 pg/ml (n=4) tras 24 horas de serodeprivación.

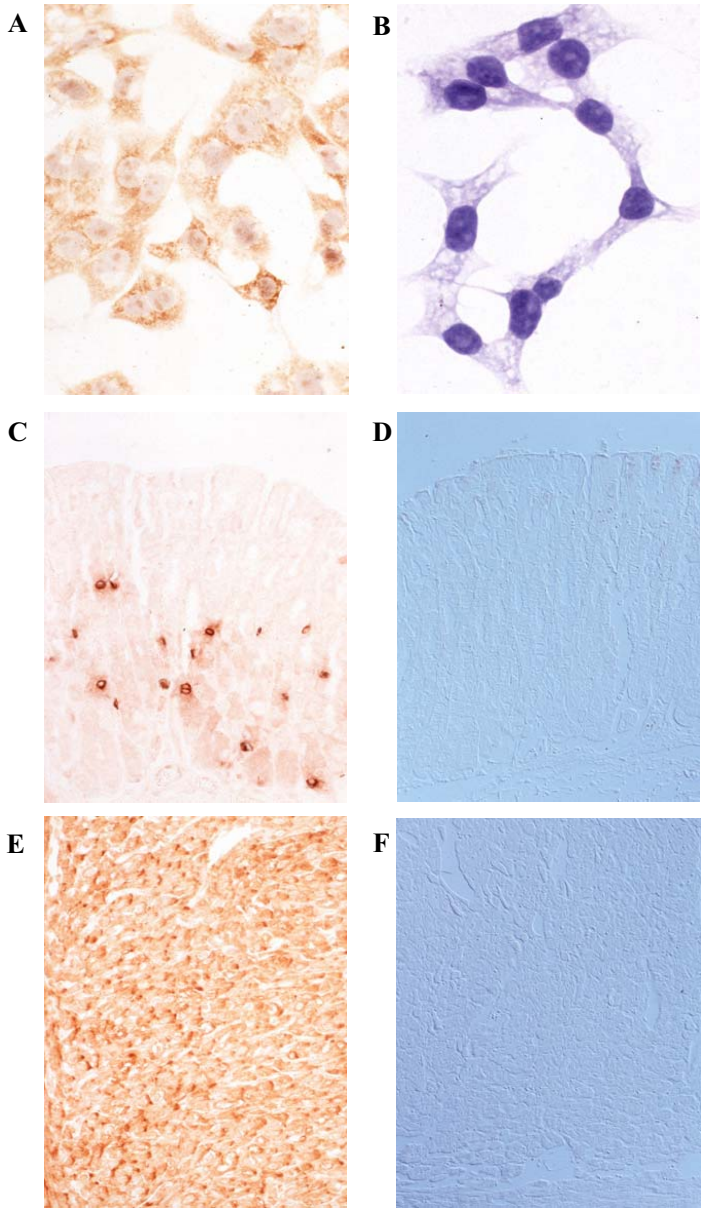


Figura 2. Inmunohistoquímica de ghrelin en cardiomiocitos HL-1.

Los cardiomiocitos HL-1 de ratón presentan inmunorreactividad para ghrelin en el citoplasma (*A*). Como control positivo de expresión proteica se utilizó estómago de ratón, en el cual se pueden ver células positivas correspondientes a la glándula oxíntica (*C*). El miocardio de ratón muestra también positividad citoplasmática (*E*). La preadsorción del anticuerpo α-ghrelin con su antígeno homólogo (ghrelin), dio lugar a la ausencia de señal de inmunorreactividad en los correspondientes controles negativos: células HL-1(*B*), estómago de ratón (*D*) y miocardio de ratón (*F*) (Contraste de interferencia diferencial Nomarsky). Objetivos: A y B, x60; C-F, x40.

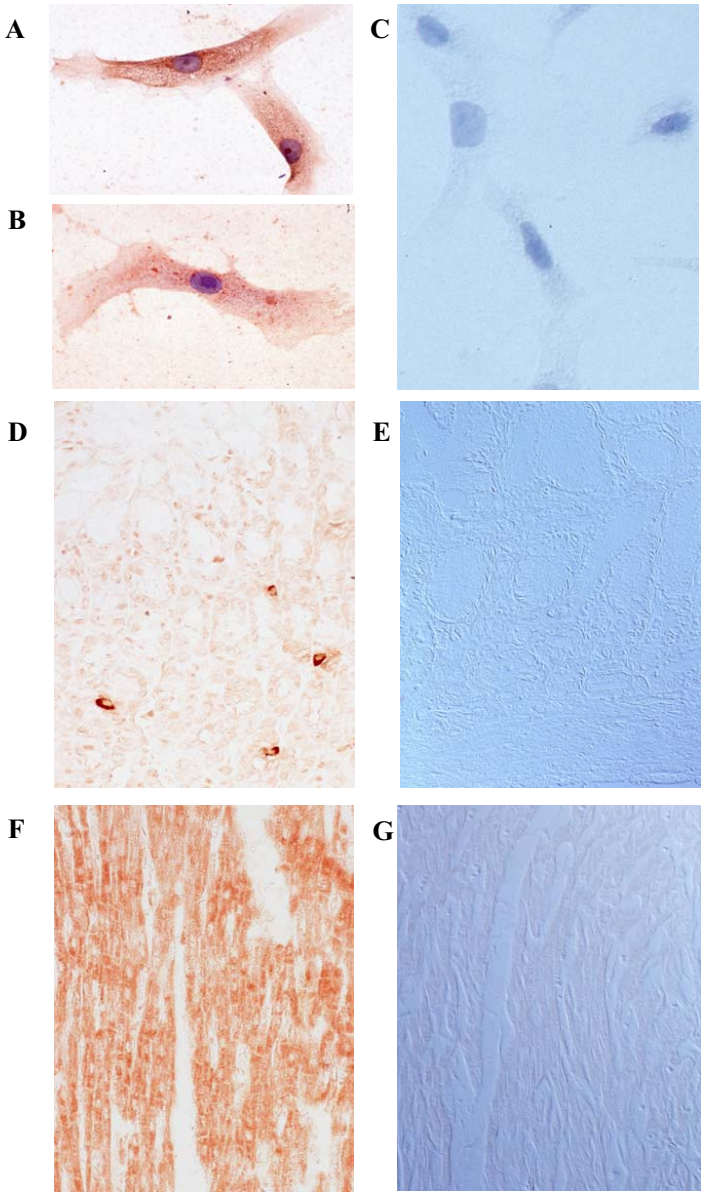


Figura 3. Inmunohistoquímica de ghrelin en cardiomiocitos humanos.

El cultivo primario de cardiomiocitos humanos muestra expresión proteica de ghrelin en el citoplasma (*A*). Los cardiomiocitos se caracterizaron realizando la reacción inmunohistoquímica para la cadena pesada de la miosina (α-MHC) (*B*). Como control positivo se utilizó estómago humano mostrando positividad en células de la glándula oxíntica (*D*). El miocardio humano muestra asimismo positividad citoplasmática (*F*). La especificidad de la inmunohistoquímica se comprobó preadsorbiendo el anticuerpo α-ghrelin con su antígeno homólogo, con lo que no se observó señal en los controles negativos: cardiomiocitos humanos (*C*), estómago humano (*E*) y miocardio humano (*G*) (Contraste de interferencia diferencial Nomarsky). Objetivos: A-C, x60; D y E, x20; F y G x40.

4. Expresión del receptor de secretatogos de GH en cardiomiocitos

La capacidad que presentan los cardiomiocitos de sintetizar y secretar ghrelin al medio de cultivo sugiere que éste puede actuar de forma autocrina/paracrina en el músculo cardíaco. Para ello el músculo cardíaco debe expresar asimismo un receptor que sea capaz de unir ghrelin y mediar sus acciones.

Mediante RT-PCR demostramos que las células HL-1 expresan el receptor de secretagogos de GH a niveles similares a los que se obtienen en corazón de ratón. El producto de amplificación obtenido tras el empleo de cebadores específicos para la secuencia del primer exón del gen del GHS-R fue de 198 pb **(Fig. 4A)**. La calidad del ARN utilizado se verificó amplificando el gen GAPDH. Como control positivo para la expresión del GHS-R, se utilizó ARN mensajero obtenido de hipófisis de ratón.

Se confirmó que el producto obtenido por RT-PCR correspondía a ghrelin mediante secuenciación.

De igual forma, mediante RT-PCR analizamos la expresión del GHS-R en cardiomiocitos humanos, utilizando cebadores específicos para la amplificación de la forma activa de este receptor en humanos. La amplificación de un fragmento de 349 pb se correspondía con el producto esperado **(Fig. 4B)**.

5. Estudio de unión ligando-receptor en células HL-1

Para determinar si el receptor presente en cardiomiocitos HL-1 era capaz de unir ghrelin, realizamos un ensayo de unión específica ligando-receptor. Este ensayo demostró que el ligando "ghrelin frío" desplaza eficazmente al ligando marcado radiactivamente **(Fig. 4C)**. Esto demuestra la existencia de un receptor capaz de unir ghrelin en cardiomiocitos HL-1 de manera eficiente y competitiva. Los datos obtenidos en este estudio se analizaron utilizando el programa Scatchard. Se realizó asimismo un análisis estadístico con tres experimentos independientes de unión específica de ghrelin en las células HL-1. Los valores de la constante de equilibrio de disociación (Kd) y el número máximo de sitios de unión (Bmax) eran respectivamente 3.03±0.8 nM y 0.14±0.06 nM (n=3). Se estima que las células HL-1 presentan alrededor de unos 170.000 receptores para ghrelin por célula.

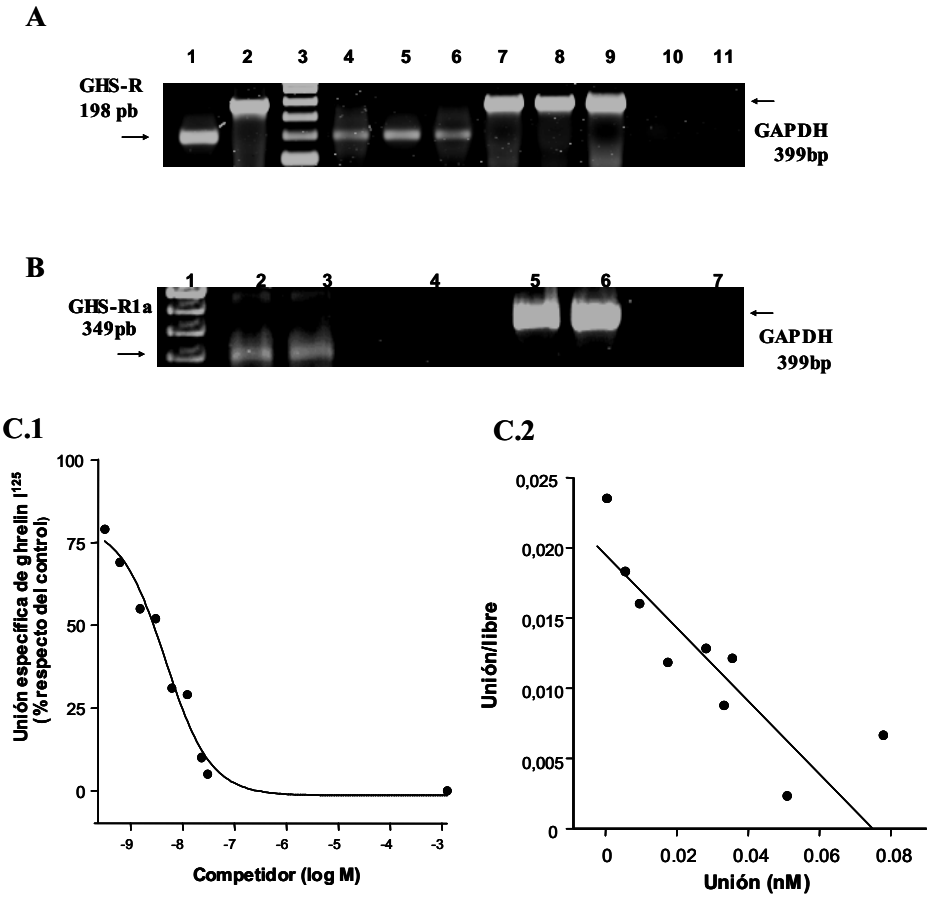


Figura 4. Análisis de la expresión génica del receptor de secretagogos de GH (GHS-R) en cardiomiocitos.

Panel A. Determinación mediante RT-PCR de la expresión del receptor GHS-R en cardiomiocitos HL-1 (calles 4-6). Como control positivo de expresión de GHS-R se amplificó ARNm de hipófisis de ratón (calle 1). Amplificación génica de GAPDH como control interno: calles 7-9, HL-1 y calle 2, hipófisis de ratón. Controles negativos de la reacción: calles 10 y 11.

Panel B. Determinación de la expresión del GHS-R1a en cardiomiocitos humanos (calles 2 y 3). Amplificación del GAPDH: calles 5 y 6. Correspondientes controles negativos de la reacción: calles 4 y 7.

Panel C. C.1 Curva de competición para el receptor de ghrelin en la línea HL-1, correspondiente a un experimento representativo de una serie de tres. A medida que aumenta la concentración de ghrelin se observa un desplazamiento del péptido marcado (^{125}I-ghrelin) de los sitios de unión. C.2 Resultado del análisis Scatchard (un experimento representativo de una serie de tres).

6. Ensayo de movilización de calcio intracelular

Para comprobar la funcionalidad del receptor de ghrelin en la línea celular HL-1 realizamos un ensayo de movilización de calcio debido a que la unión de ghrelin al receptor clásico de secretagogos de GH activa una ruta de señalización que conlleva entre otras modificaciones el aumento de la concentración de calcio intracelular.

Como control positivo de la funcionalidad del receptor utilizamos la línea celular HEK-293, transfectada de forma estable con el receptor GHS-R1a. La administración de ghrelin (100 nM) provoca la movilización de calcio intracelular en las células HEK-293 **(Fig. 5)**.

La administración de ghrelin, tanto a dosis de 100 nM como de 1 μM, no induce movilización del calcio intracelular en la línea cardiomiocitaria HL-1 **(Fig. 5)**. Como control de activación de las rutas intracelulares de calcio en este tipo celular se añadió LPA, que sí indujo movilización del calcio intracelular en cardiomiocitos HL-1 **(Fig. 5)**.

A pesar de que la línea celular HL-1 expresa GHS-R, y de que ghrelin presenta afinidad por los sitios de unión presentes en la línea cardiomiocitaria HL-1, no podemos discriminar si los efectos de ghrelin sobre este tipo celular ocurren a través de la activación del receptor GHS-R o a través de un nuevo tipo de receptor aún por caracterizar.

7. Regulación de la expresión de ghrelin

Mediante RT-PCR analizamos los niveles de expresión del ARNm de ghrelin en células HL-1 expuestas a tratamientos pro- y anti-apoptóticos (tratamiento con 100 μM de AraC y pretratamiento con GH (1 μg/μl), respectivamente). Los resultados obtenidos fueron una disminución de los niveles de ARNm de ghrelin en un 33.0±7.1% en las células tratadas 12 horas con AraC ($p<0.05$, $n=3$), y un incremento de un 48.8±13.9% ($p<0.05$, $n=3$) de los niveles ARNm cuando las células se trataron con GH durante 12 horas, previamente al tratamiento con AraC, con respecto a células HL-1 sin tratamiento alguno **(Fig. 6)**.

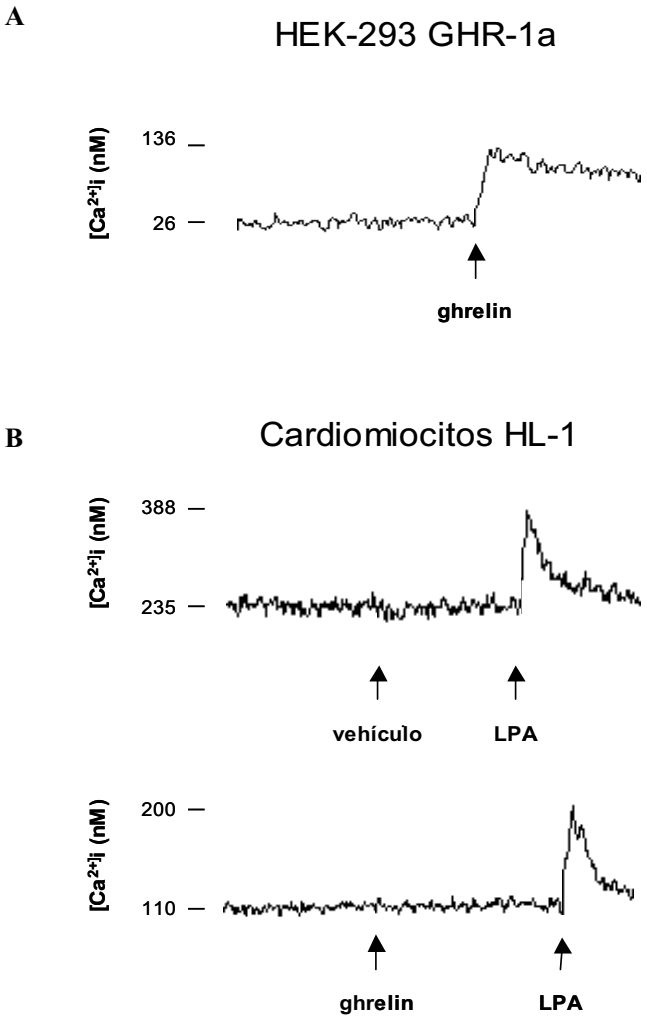


Figura 5. Análisis de movilización de calcio en la línea HL-1.

Panel A. La administración de ghrelin (100 nM) en las células HEK 293, transfectadas con el receptor GHS-R1a, provoca un aumento de la concentración de calcio intracelular.

Panel B. La administración de ghrelin (1 μM), o de su vehículo, no modifica los valores de concentración de calcio intracelular en las células HL-1. El compuesto LPA (2,3 μM) se utilizó como control positivo de movilización de calcio en cardiomiocitos HL-1.

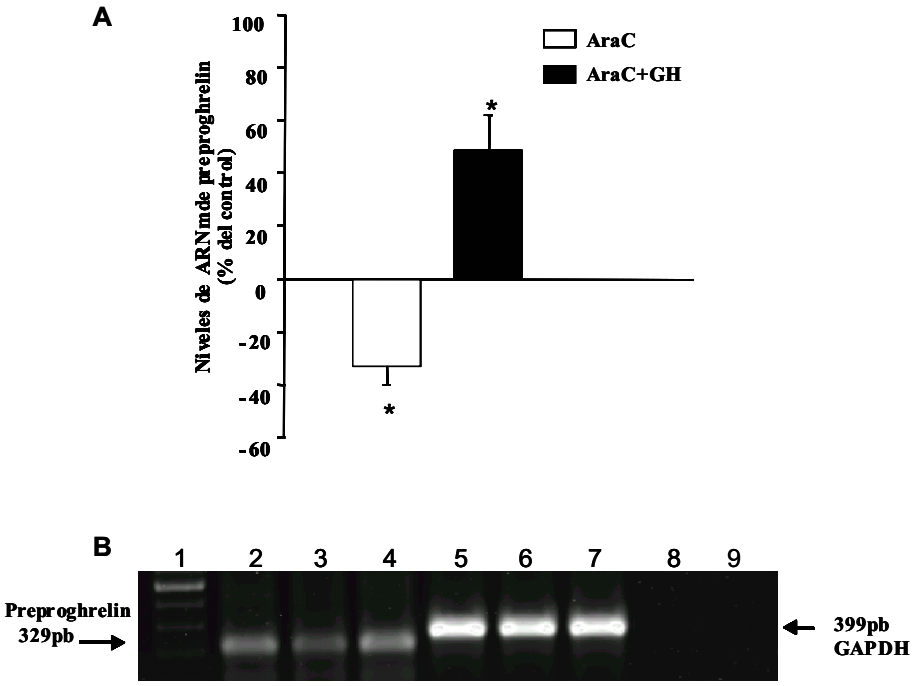


Figura 6. La expresión génica de ghrelin en cardiomiocitos HL-1 está regulada por agentes pro y anti-apoptóticos.

Panel A. Análisis estadístico de los niveles de expresión de ARNm de prepro-ghrelin. El tratamiento con AraC (100 μM) durante 12 horas reduce significativamente los niveles de ARNm de prepro-ghrelin con respecto a las células control. El pretratamiento durante 12 horas con GH (1 μg/μl), inhibe el efecto pro-apoptótico de AraC, y los niveles de ARNm de prepro-ghrelin están incrementados con respecto al control (n=3, *, $p<0.05$).

Panel B. Resultado de RT-PCR de un experimento representativo de una serie de tres experimentos independientes. Células control (calle 2); 12 horas de tratamiento con AraC (calle 3); 12 horas de pretratamiento con GH y 12 horas de tratamiento con AraC (calle 4). Amplificación correspondiente de los GAPDH de los tratamientos: calles 5-7. Controles negativos de la reacción: calles 8 y 9.

8. Ghrelin y Des-G y viabilidad cardiomiocitaria

Como se puede ver en las **figura 7**, el tratamiento con ghrelin durante 48 y 72 horas, o con Des-G durante 48 horas, no modifica la actividad metabólica de las células HL-l, analizada mediante el ensayo MTT.

El tratamiento con ghrelin, en el rango de dosis 1 pM, 1 nM y 1 μM, no modifica significativamente el nivel basal de apoptosis de la línea HL-1 tras 24 horas de tratamiento **(Fig. 8)**.

Por otra parte, el pretratamiento con 0.1 μM de ghrelin, 0.1 μM de Des-G, o la combinación equimolar de ambos durante 12 horas protege frente a la inducción de apoptosis por parte el agente citostático AraC (100 μM). Los niveles de apoptosis se cuantificaron mediante el método de tinción vital Hoechst. Los cardiomiocitos pretratados durante 12 horas con ghrelin (0.1 μM) y posteriormente con AraC presentan un 7.6± 1.0% de apoptosis frente al 14.9±1.8% de las células tratadas solamente con AraC (100μM) ($p<0.05$, n=3) **(Fig. 9A)**. Un efecto similar ocurre cuando se pretratan las células con Des-G o con la combinación de ghrelin y Des-G (7.12±0.86% AraC+ Des-G frente a un 12.83±0.79% AraC (n=3, $p<0.01$) **(Fig. 9B)** y un 16.02±1.41% AraC+ghrelin+Des-G frente a un 23.86±0.68% AraC (n=3, $p<0.05$) **(Fig. 9C)**, respectivamente).

9. Estudio del papel de ghrelin y Des-G en el metabolismo de lípidos

El estudio del posible papel de ghrelin y Des-G sobre el metabolismo de lípidos en la línea celular HL-1 se analizó mediante el ensayo de captación de ácidos grasos de cadena larga.

El tratamiento con dosis crecientes de ghrelin durante 15 minutos no modifica significativamente la captación de ácidos grasos por parte de cardiomiocitos HL-1, aunque hay una ligera tendencia a la disminución de la captación de ácidos grasos tras el tratamiento con ghrelin con respecto a las células control **(Fig. 10)**.

El tratamiento realizado en las mismas condiciones con dosis crecientes de Des-G provoca un incremento significativo de la captación de ácidos grasos por cardiomiocitos HL-1. Las dosis de 1 μM y 3 μM de Des-G inducen un aumento del 30±6% y 30±8% ($p<0.01$, n=5), respectivamente, frente a las células control **(Fig. 10)**.

El tratamiento conjunto con dosis elevadas (1 y 3 μM) de ghrelin y Des-G no modifica los niveles de captación de ácidos grasos por cardiomiocitos HL-1. Ghrelin parece por tanto contrarrestar el efecto ejercido por Des-G sobre el metabolismo de lípidos en la línea cardiomiocitaria HL-1 **(Fig. 10)**.

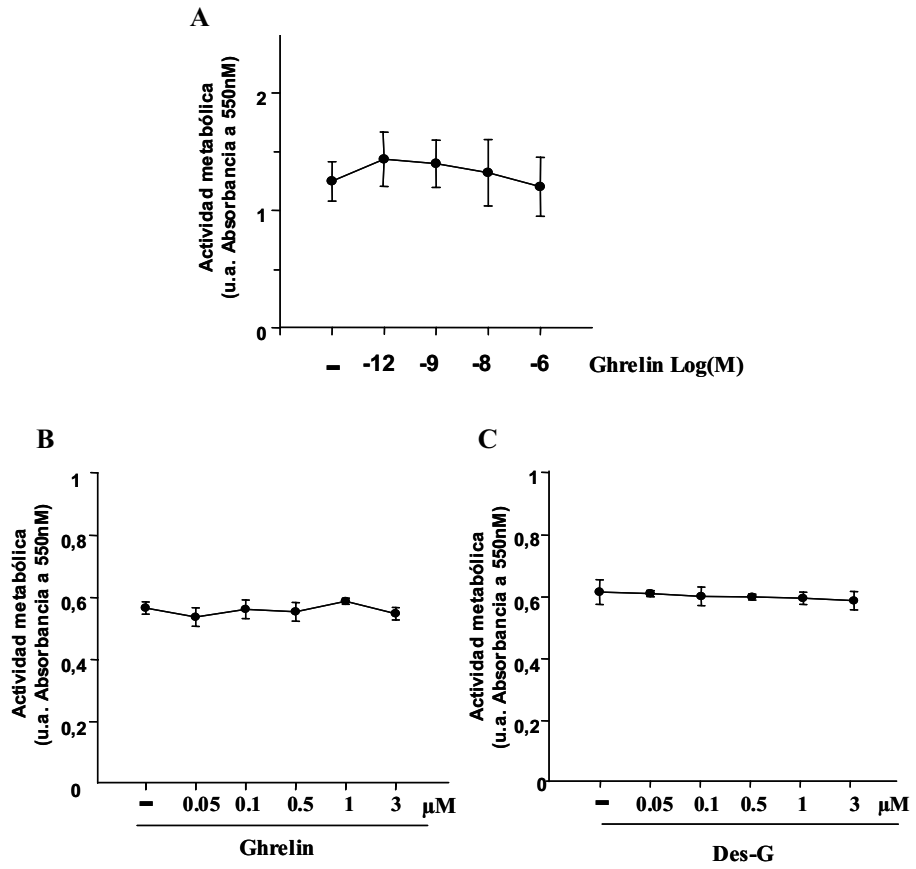


Figura 7. Análisis de la actividad metabólica en la línea celular HL-1 mediante el ensayo MTT. El tratamiento dosis respuesta con ghrelin durante 72 horas (*A*), o durante 48 horas (*B*), no modifica la actividad metabólica de cardiomiocitos HL-1 (n=3 en ambos ensayos). Asimismo, el tratamiento con Des-G (0.05-3 μM) durante 48 horas (*C*) tampoco modifica la actividad metabólica de cardiomiocitos HL-1 con respecto a las células sin tratamiento (n=3).

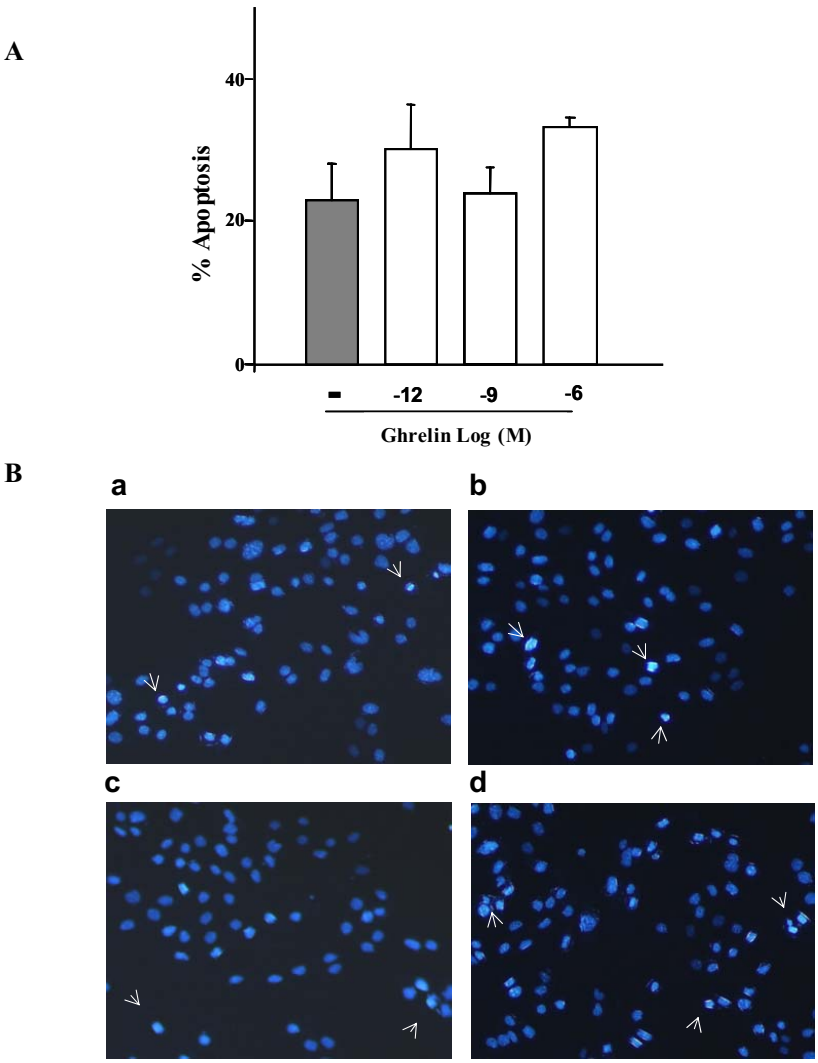


Figura 8. Efecto de ghrelin sobre la apoptosis basal en cardiomiocitos HL-1. *Panel A*. Gráfica representativa de tres experimentos independientes analizados por tinción vital Hoechst 33258. El tratamiento con ghrelin durante 24 horas no modifica el nivel basal de apoptosis en la línea HL-1.

Panel B. Análisis de apoptosis por tinción vital Hoechst en cardiomiocitos HL-1. Fotografías (200x) correspondientes a un experimento representativo de una serie de tres; a) células control, b-d) células tratadas con ghrelin, 10^{-12} M, 10^{-9} M, 10^{-6}M respectivamente. Los núcleos que presentan mayor fluorescencia se corresponden con las células apoptóticas.

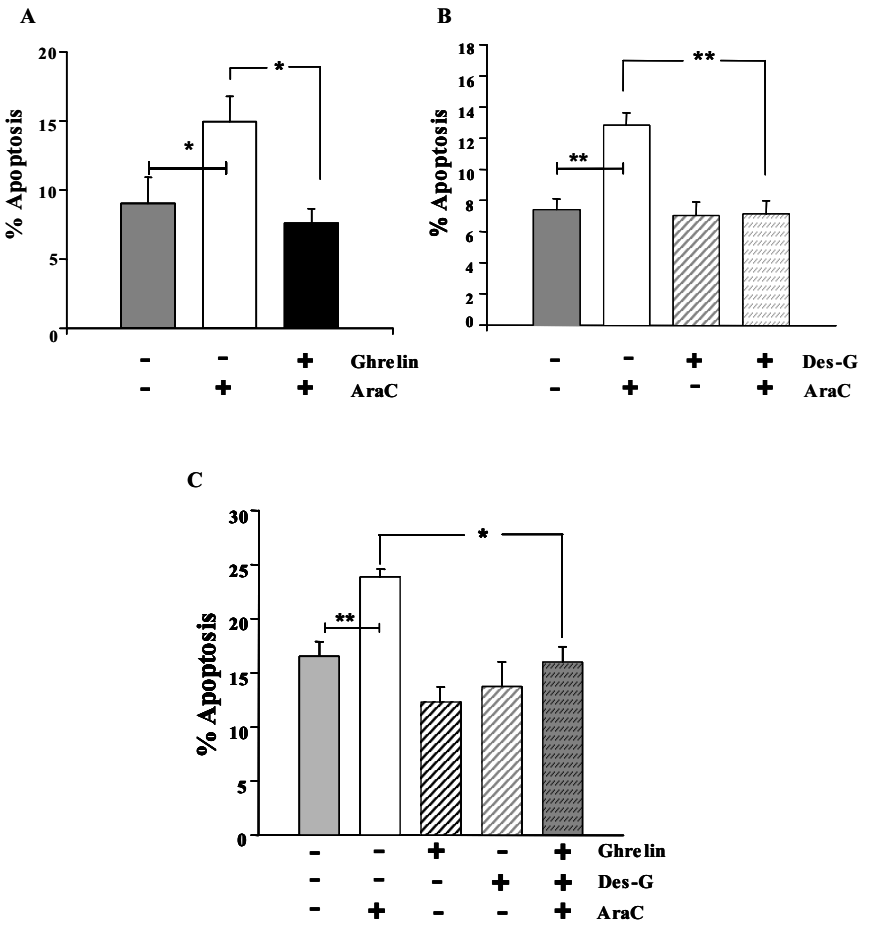


Figura 9. Efecto de ghrelin y Des-G sobre la apoptosis inducida por AraC en células HL-1 analizado mediante tinción vital Hoechst.

Panel A. El pretratamiento con ghrelin (0.1 µM) durante 12 horas ejerce un efecto cardioprotector frente a la inducción de apoptosis por exposición a AraC (0.1 µM, 12 horas) (n= 3, *, $p<0.05$).

Panel B: Des-G (0.1 µM, pretratamiento de 12 horas) ejerce un efecto similar a ghrelin frente a la apoptosis inducida por AraC (0.1 µM, 12 horas) (n= 3, **, $p<0.01$).

Panel C: El co-tratamiento equimolar con ghrelin y Des-G (0.1 µM) durante 12 horas reduce asimismo los niveles de apoptosis inducida por AraC (100 µM) (n= 4, * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

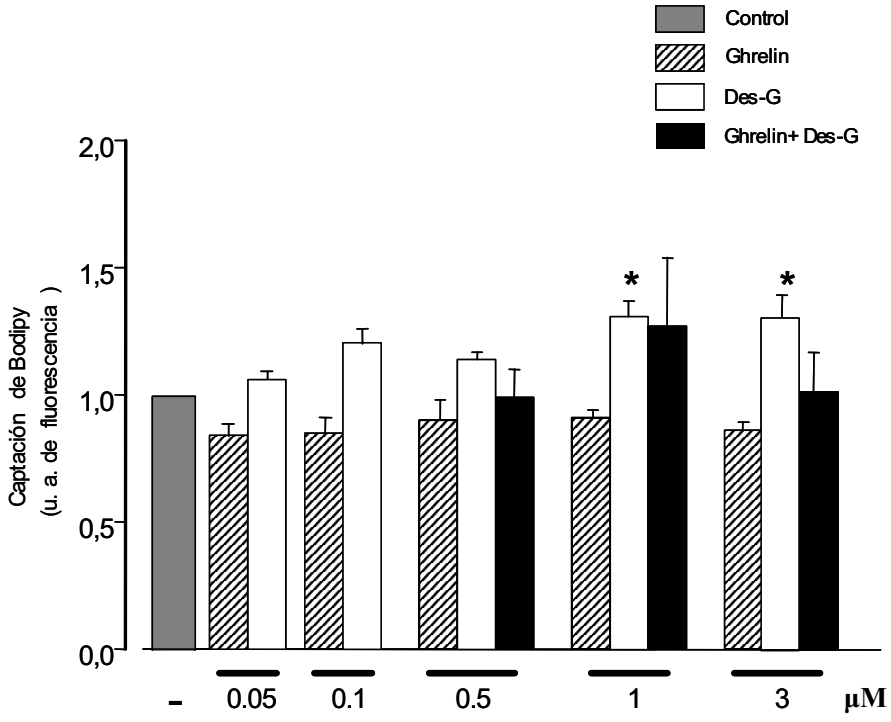


Figura 10. Análisis del efecto de ghrelin y Des-G sobre la captación de ácidos grasos en la línea HL-1.

El tratamiento con ghrelin (0.05-3 µM, 15 minutos) no modifica los valores de captación de ácidos grasos de cadena larga (n=4) por parte de cardiomiocitos HL-1. El tratamiento con Des-G (1 y 3 µM, 15 minutos) aumenta significativamente la captación de ácidos grasos (n=5, * $p<0.05$), con respecto a las células sin tratamiento. El tratamiento combinado y equimolar de ghrelin y Des-G no provoca ningún efecto significativo sobre el metabolismo de lípidos, incluso a las dosis de mayor rango analizadas (n=4).

10. Estudio del papel de ghrelin y Des-G en el metabolismo de la glucosa

Se examinaron los niveles de captación de glucosa tras el tratamiento con ghrelin, Des-G o la combinación de ambos de la línea cardiomiocitaria HL-1. Como control positivo, se indujo la captación de glucosa mediante el tratamiento con insulina. En las células HL-1 la administración de insulina durante una hora a la dosis de 100 nM aumenta la captación de glucosa en un 47±12% ($p<0.01$, n=5) con respecto al control. El tratamiento con ghrelin (30 minutos, 3 µM) reduce ligeramente el nivel basal de

captación de glucosa en la línea HL-1, aunque este efecto no llega a alcanzar significatividad estadística. El co-tratamiento con ghrelin reduce significativamente los niveles de captación inducidos por la insulina sola (18±11% ($p<0.05$, n=5) **(Fig. 11A)**.

La administración de Des-G (30 minutos, 3 μM) no alteró significativamente la captación de glucosa, tanto basal como inducida por insulina **(Fig. 11B)**.

Se analizó también el efecto del tratamiento conjunto y equimolar de ghrelin y Des-G. Tras la estimulación de la captación de glucosa por insulina, se realizó un tratamiento conjunto con ghrelin y Des-G (3 μM cada uno). El tratamiento conjunto con ghrelin y Des-G no modifica el aumento de la captación de glucosa inducido por insulina (42±13%, $p<0,05$, n=3 y 38±11%, $p<0.05$, n=3, respectivamente, frente al control**)** **(Fig. 11C)**. La combinación de ghrelin y Des-G tampoco modificó significativamente los niveles basales de captación de glucosa en la línea celular HL-1 **(Fig. 11C)**.

11. Estudio de la posible interacción de las rutas metabólicas de ghrelin y Des-G y la insulina

Tras determinar que ghrelin reduce significativamente los niveles de captación de glucosa estimulados por insulina, se trató de analizar el posible punto de interacción con la ruta de señalización de la insulina en el que se produce esta reducción.

El primer punto analizado fue la expresión de la proteína PTEN (Phosphatase and tensin homolog delected on chromosome ten) en la línea HL-1. Esta proteína está regulando la formación de PtdIns(3,4,5)P_3 a partir de PtdIns(4,5)P_3, necesaria para la posterior activación de Akt. Tras el análisis por Western blot no se encontraron diferencias de expresión proteica de PTEN, tras el tratamiento con insulina, ghrelin, Des-G o las combinaciones realizadas con dos o tres de los péptidos **(Fig. 12)**.

El segundo punto de análisis fue la activación de la proteína Akt, presente en la parte final de la ruta de señalización de la insulina. Mediante Western Blot se cuantificaron los niveles de activación de Akt analizando la fosforilación de la proteína. Como se puede ver en la **figura 13**, la insulina activa Akt en cardiomiocitos HL-1. El tratamiento con ghrelin, Des-G, o ambos péptidos no modifica significativamente la activación de Akt inducida por insulina **(Fig. 13)**.

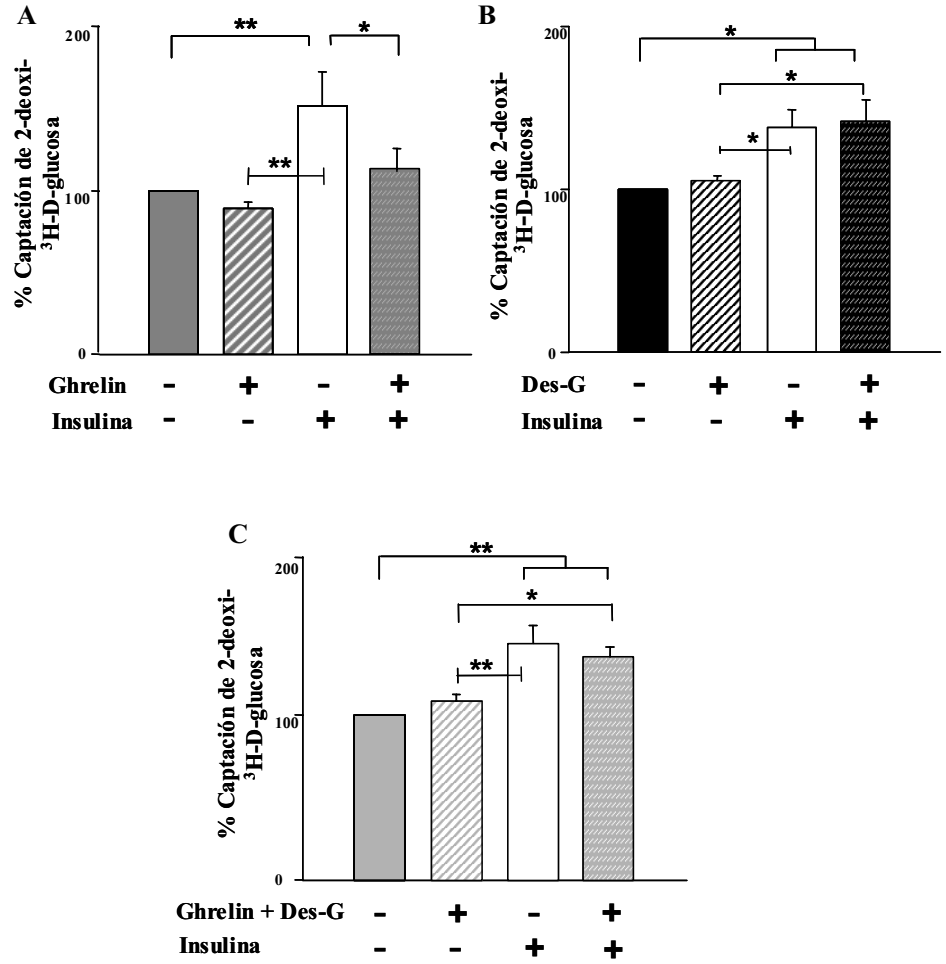


Figura 11. Análisis del efecto de ghrelin y Des-G sobre la captación de 2-deoxi-D-^{3}H-glucosa en la línea HL-1.

Panel A. El tratamiento con ghrelin (3 µM, 30 minutos) inhibe significativamente la captación de 2-deoxi-D-[^{3}H]-glucosa inducida por insulina (100 nM, 1 hora) (n=5).

Panel B. El tratamiento con Des-G (3 µM) durante 30 minutos no modifica los valores de captación de glucosa inducidos por insulina (100 nM; 1 hora) (n=3).

Panel C. El tratamiento conjunto con Des-G previene el efecto inhibitorio de ghrelin sobre la captación de glucosa inducida por insulina en la línea celular HL-1 (n=5).

(**, $p<0.01$; *, $p<0.05$)

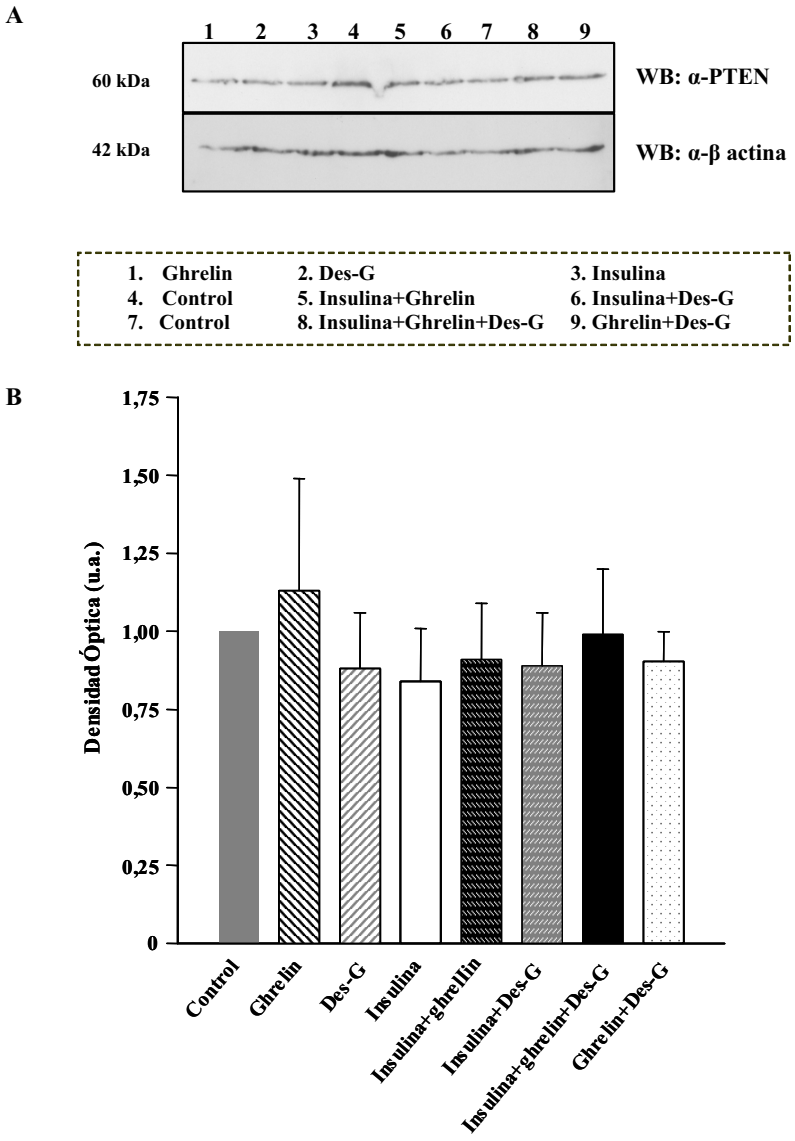


Figura 12. Análisis del efecto de ghrelin y Des-G sobre los niveles proteicos de PTEN en la línea HL-1.

Panel A. Western Blot representativo de una serie de tres experimentos independientes mostrando el efecto del tratamiento con ghrelin (30min, 3 μM), Des-G (30min, 3 μM) y/o insulina (1h, 100 nM) sobre la síntesis de PTEN.

Panel B. Representación gráfica del análisis estadístico de tres ensayos de Western blot independientes. Los niveles de PTEN se han correlacionado con los niveles de expresión proteica α-β actina.

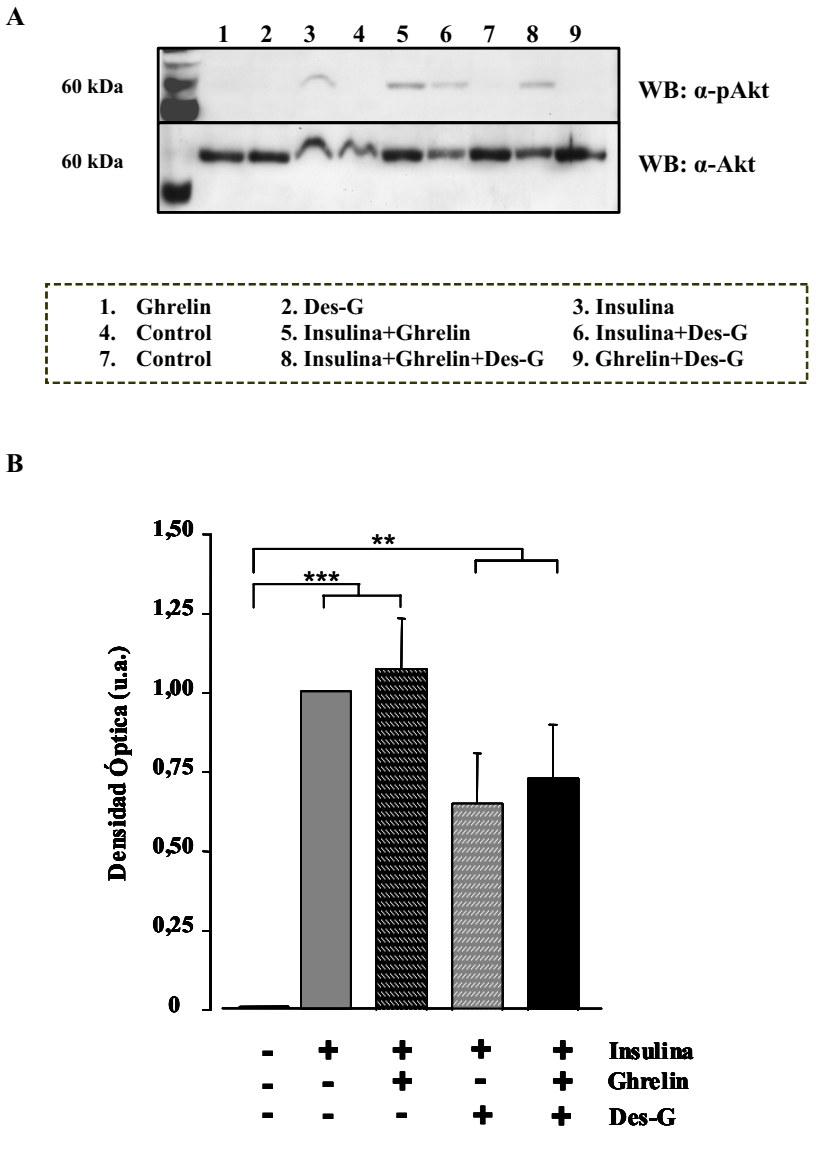


Figura 13. Análisis del efecto de ghrelin y Des-G sobre la activación de Akt en la línea HL-1.

Panel A. Western Blot representativo de una serie de cuatro experimentos independientes mostrando el efecto de los tratamientos con ghrelin (30min, 3 μM), Des-G (30min, 3 μM) y/o insulina (1h, 100 nM) sobre la fosforilación de Akt.

Panel B. Representación estadística de cuatro ensayos independientes de Western blot. Los niveles de fosforilación de Akt (pAkt) se han correlacionado con los niveles de expresión de esta proteína. (**, $p<0.01$; *** $p<0.001$)

Obestatina y GPR39

1. Expresión del receptor de obestatina (GPR39) en cardiomiocitos

Mediante RT-PCR demostramos que las células HL-1 y los cardiomiocitos neonatales de rata expresan el receptor de obestatina. Tras el empleo de cebadores específicos se obtuvo un producto de amplificación de 190 pb (**Fig. 14 A y B**). La calidad del ARN utilizado se verificó amplificando el gen GAPDH. Como control positivo de expresión del GPR39, se utilizó ARNm de estómago de ratón.

De la misma manera, el tejido atrial humano expresa ARNm de GPR39, como se observa tras la amplificación de un fragmento de 184 pb que se correspondía con el producto esperado según la secuencia del gen humano **(Fig. 14C)**. Como control positivo de expresión de GPR39, se utilizó ARNm de estómago humano. De igual forma que en el análisis anterior, la calidad del ARN analizado se verificó con la amplificación del gen GAPDH.

2. Estudio de unión ligando-receptor en células HL-1

Analizamos la capacidad de unir obestatina del GPR39 presente en cardiomiocitos HL-1. El ensayo de competición ligando-receptor demostró que concentraciones crecientes de obestatina desplazan eficazmente a la hormona marcada radiactivamente **(Fig. 15).** Los valores de la constante de equilibrio de disociación (Kd) y el número máximo de sitios de unión (Bmax) eran, respectivamente, 16.5 nM y 0.026 nM. Según el análisis Scatchard (n=3) se estima que las células HL-1 presentan alrededor de unos 700 receptores para obestatina por célula.

3. Obestatina y viabilidad cardiomiocitaria

El tratamiento con obestatina (5 μM, 48 horas) redujo en un 22±2.28% ($p<0.001$ n=3) la actividad metabólica mitocondrial de las células HL-l, como se observó tras realizar el ensayo MTT **(Fig. 16A)**.

Sin embargo, el tratamiento con obestatina no modificó significativamente el nivel basal de apoptosis de la línea HL-1 tras 24 o 48 horas de tratamiento, como puede observarse tras los ensayos de citometría de flujo o tinción vital Hoechst **(Fig. 16)**.

Además, en el análisis de citometría de flujo no se detectan diferencias en el porcentaje de células en las fases de G_0/G_1 o síntesis/mitosis entre los distintos tratamientos con obestatina **(Fig. 16C)**.

4. Estudio del papel de la obestatina en el metabolismo de lípidos

Se analizó el posible papel de obestatina sobre el metabolismo de lípidos en la línea celular HL-1 mediante un ensayo de captación de ácidos grasos de cadena larga.

El tratamiento con dosis crecientes de obestatina durante 30 minutos, no modificó la captación de ácidos grasos por parte de cardiomiocitos HL-1 **(Fig. 17A)**.

5. Estudio del papel de la obestatina en el metabolismo de la glucosa

La administración de obestatina no provocó alteraciones en los niveles basales de captación de glucosa por cardiomiocitos HL-1. El tratamiento con insulina durante una hora a la dosis de 100 nM se utilizó como control positivo de la captación de glucosa induciendo un incremento de la misma de un 33±7% respecto al control ($p<0.05$, $n=6$). La cytochalasin B se utilizó como control negativo, causando una reducción de la captación de glucosa de un 66±6% respecto al control ($p<0.001$, $n=6$) **(Fig. 17B)**.

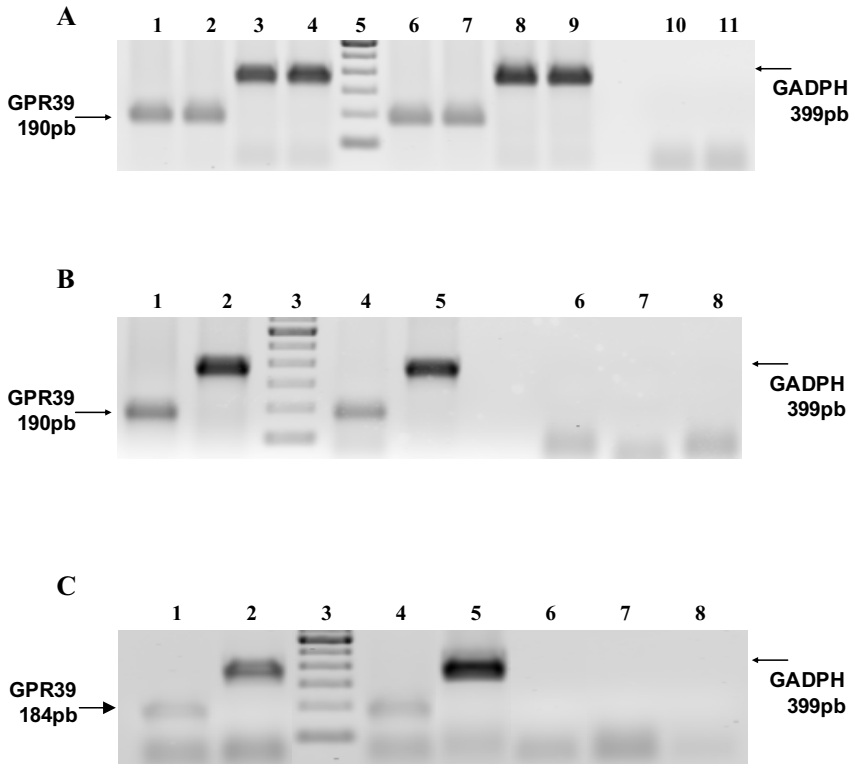


Figura 14. Expresión génica de GPR39 en cardiomiocitos.

Panel A. RT-PCR de GPR39 en la línea celular HL-1 (calles 6 y 7). Como control positivo de expresión de GPR39 amplificamos ARNm de estómago de ratón (calles 1 y 2). Amplificación del gen para GAPDH :calles 3-4 y 8-9. Controles negativos de la reacción: calles 10 y 11.

Panel B. RT-PCR de GPR39 en cardiomiocitos neonatales de rata (calle 4) Como control positivo de expresión se amplificó ARNm de estómago de ratón (calle 1). Amplificación del gen para GAPDH: calles 2 y 5. Controles negativos de la reacción: calles 6-8.

Panel C. RT-PCR de GPR39 en tejido atrial humano (calle 4) Como control positivo de expresión se amplificó ARNm de estómago humano (calle 1). Amplificación del gen para GAPDH: calles 2 y 5. Controles negativos de la reacción: calles 6-8.

.

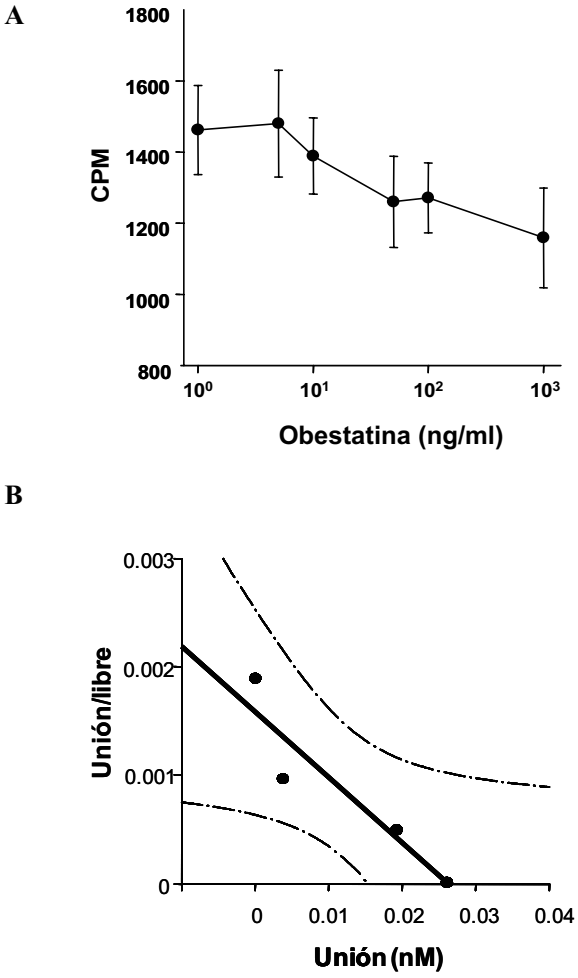


Figura 15. Estudio de unión ligando-receptor para GPR39 en cardiomiocitos HL-1.

Panel A. Análisis de competición para el receptor de obestatina en la línea HL-1 (n=3). Existe un desplazamiento por los sitios de unión de ^{125}I-obestatina (cuentas por minuto) a medida que aumenta la concentración del competidor (obestatina).

Panel B. Resultado del análisis Scatchard correspondiente a tres experimentos independientes.

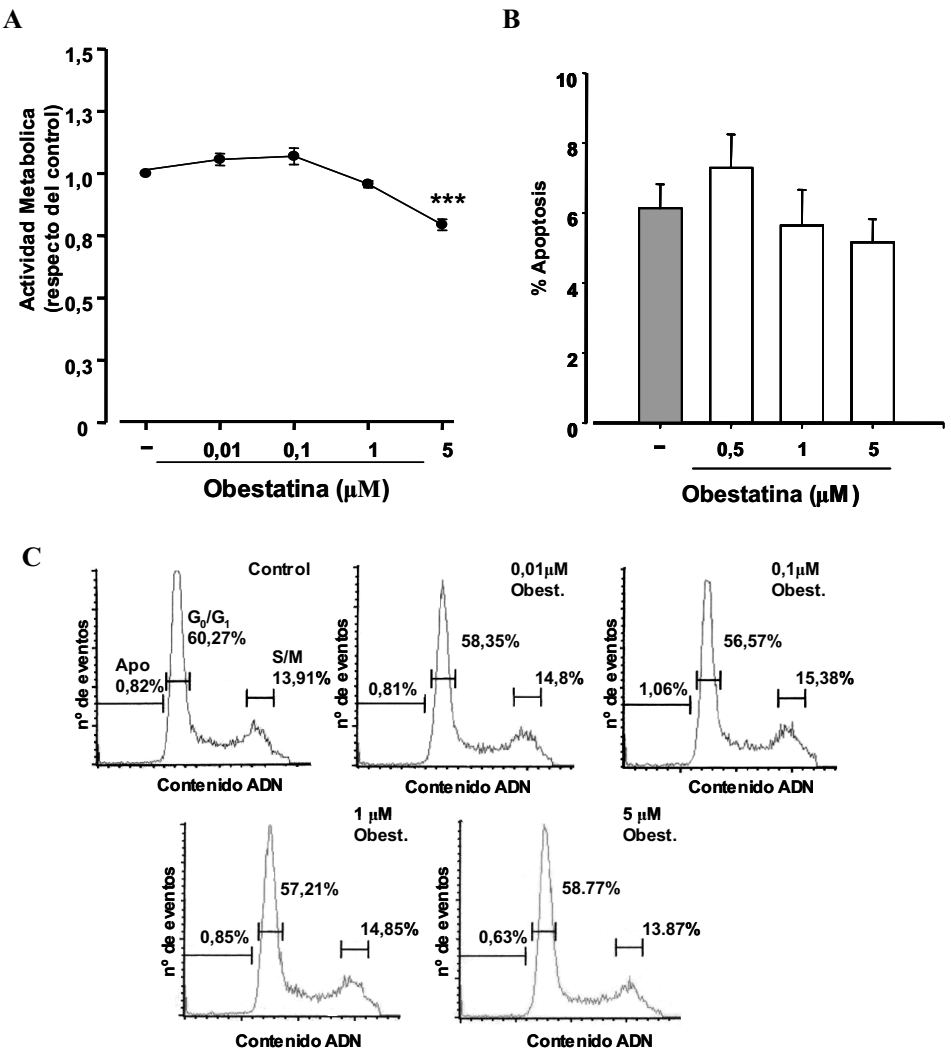


Figura 16. Estudio del efecto de obestatina sobre viabilidad y ciclo celular en células HL-1.

Panel A. Resultado del análisis MTT. El tratamiento con obestatina (5 μM, 48 horas) disminuye la actividad metabólica de la línea cardiomiocitaria HL-1 ($p<0,001$, n=3).

Panel B. Representación estadística del análisis por tinción vital Hoechst. El tratamiento durante 48 horas con obestatina no modifica los valores de apoptosis basal (n=3) en cardiomiocitos HL-1.

Panel C. Análisis mediante citometría de flujo del ciclo celular de cardiomiocitos HL-1 tras el tratamiento con obestatina (0,01-5 μM; 24 horas). Se muestran los porcentajes correspondientes al número de células en cada fase del ciclo celular, apoptosis (apo), fase G_0/G_1 (2n), y fase síntesis/mitosis (S/M) (4n). Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de una serie de dos realizados.

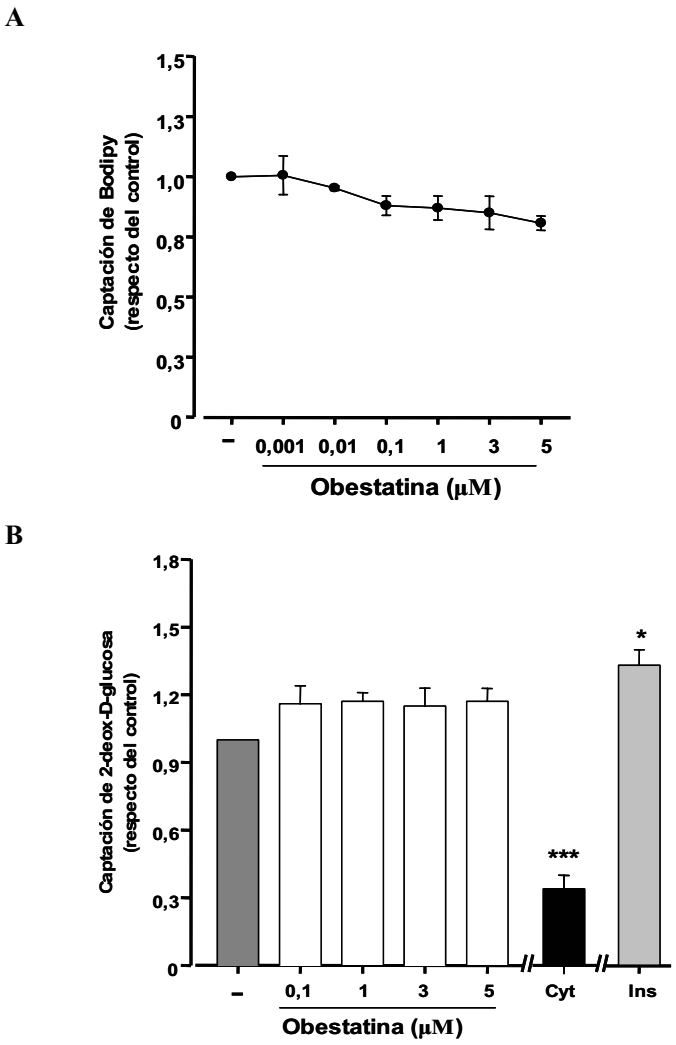


Figura 17. Estudio del tratamiento con obestatina sobre el metabolismo de lípidos y de glucosa en cardiomiocitos HL-1.

Panel A. Análisis estadístico de los estudios de captación de ácidos grasos libres (Bodipy) en células HL-1(n=3) tras el tratamiento con obestatina (0.001-5 μM, 30 min).

Panel B. Análisis estadístico de los estudios de captación de glucosa en cardiomiocitos HL-1 tras el tratamiento con obestatina durante 30 minutos. Como control positivo se utilizó insulina (100 nM) y como control negativo cytochalasin B (10 μM).

(n=6 * $p<0,05$; ***$p<0,001$).

Discusión

1. Expresión de ghrelin y su receptor en cardiomiocitos

1.1 Ghrelin

El descubrimiento de ghrelin por el grupo de Kangawa (1999), del Centro Nacional Cardiovascular de Osaka en Japón, se produjo tras una serie de ensayos que intentaban determinar el secretagogo natural para el receptor de secretagogos de GH (Kojima y col., 1999).

El estudio de los efectos cardiovasculares de ghrelin constituyó rápidamente tras su identificación una línea de investigación preferente. Se observó que la administración intravenosa de ghrelin (10 μg/kg) en individuos jóvenes y sanos causaba una reducción de la media de la presión arterial y una elevación del índice y volumen cardíaco sin alterar la frecuencia cardíaca (Nagaya y col., 2001a). En cambio, cuando la administración de ghrelin se realizaba vía subcutánea solamente se modificaba la función cardíaca a nivel del ventrículo izquierdo (aumento de la fracción de eyección y disminución del volumen final sistólico) sin modificar el valor de la media de la presión arterial (Enomoto y col., 2003).

Por otro lado, en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica la administración intravenosa de ghrelin, al igual que ocurría en individuos sanos, reducía la media de la presión arterial y mejoraba la función cardíaca (Nagaya y col., 2001b). En estos pacientes se analizaron también parámetros hemodinámicos renales y pulmonares que no se veían afectados por el tratamiento con ghrelin (Nagaya y col., 2001b).

Pero el papel de ghrelin sobre la regulación del sistema cardiovascular en humanos podría no sólo centrarse en modular parámetros hemodinámicos. Pacientes con insuficiencia cardíaca crónica avanzada, presentan disfunción del ventrículo izquierdo y caquexia cardíaca, y sus niveles plasmáticos de ghrelin se correlacionan negativamente con la presencia de caquexia (Nagaya y col., 2001c; Nagaya y Kangawa, 2003a). Se ha sugerido que la elevación de los niveles de ghrelin se debe a un mecanismo de compensación para recuperar el balance entre catabolismo/anabolismo ausente en estos pacientes. Se sabe que la administración crónica de ghrelin en ratas con insuficiencia cardíaca crónica, además de mejorar parámetros hemodinámicos y atenuar el remodelado cardíaco, favorece el aumento de peso corporal e induce adiposidad (Nagaya y col., 2001d) mejorando la condición metabólica de estos animales. A raíz de estos resultados se podría sugerir un papel fundamental de ghrelin como factor

orexigénico para atenuar el desarrollo de patologías cardíacas con alteraciones metabólicas importantes como la caquexia (Nagaya y col., 2001c; Nagaya y col., 2001d; Nagaya y Kangawa, 2003a).

Estos mecanismos beneficiosos ejercidos por ghrelin sobre la función ventricular izquierda y el metabolismo energético en la insuficiencia cardíaca crónica podrían deberse al hecho de que ghrelin actúa como modulador del eje GH/IGF-1, que a su vez tiene efectos hemodinámicos y anabólicos en el sistema cardiovascular (Nagaya y Kangawa, 2003b). Sin embargo, se sabe que ghrelin presenta receptores específicos en miocardio y vasos (Gnapanavan y col., 2002; Nagaya y col., 2001a) por lo que puede actuar de forma directa sobre el sistema cardiovascular. Además el efecto que provoca ghrelin sobre el aumento de la ingesta y adiposidad puede producirse de forma independiente de GH (Tschöp y col., 2000; Nakazato y col., 2001). Por lo tanto los efectos que ejerce ghrelin sobre la actividad cardiovascular podrían atribuirse a mecanismos dependientes e independientes de GH (Kojima y Kangawa, 2005).

Los estudios realizados en animales de experimentación también muestran que ghrelin ejerce efectos sobre parámetros hemodinámicos. En conejos la administración de ghrelin *i.v.* o *i.c.v.* reduce la media de la presión arterial y sólo la administración *i.c.v.* reduce la actividad del nervio simpático renal (Matsumura y col., 2002). Estudios posteriores en ratas muestran que la microinyección tanto de ghrelin como de Des-G sobre el núcleo tracto solitario (NTS), provoca hipotensión y bradicardia a través de la inhibición de la actividad del simpático (Lin y col., 2004; Tsubota y col., 2005). A pesar de que en el NTS se expresa GHS-R no queda claro si el efecto provocado por ghrelin esta mediado por este receptor, ya que Des-G ejerce el mismo efecto que ghrelin y, como se sabe, no es capaz de unirse al GHS-R (Lin y col., 2004; Tsubota y col., 2005).

Por ultimo, cabe destacar también el importante papel de ghrelin como cardioprotector. El proceso de isquemia-reperfusión o el tratamiento farmacológico con isoproterenol provoca daño en el miocardio e insuficiencia cardíaca que ghrelin es capaz de reducir, recuperando la función cardíaca y modulando el metabolismo (reduce la actividad del enzima lactato deshidrogenasa y la liberación de malondialdehído) (Chang y col., 2004a; Chang y col., 2004b). A nivel celular, sobre la línea cardiomiocitaria H9c2, tanto ghrelin como Des-G reducen la apoptosis inducida por el tratamiento

farmacológico con doxorubicina, actuando por tanto ambos como agentes cardioprotectores (Baldanzi y col., 2002).

Todos estos datos dan solidez a la primera hipótesis planteada por el grupo de Kojima y colaboradores (1999), en la que presuponían un importante papel de ghrelin sobre la regulación de la función cardiovascular.

Con anterioridad a estos estudios funcionales, se había analizado la expresión de ghrelin no sólo en estómago, sino en otros muchos tejidos, detectándose incluso en corazón, aunque en ese momento no se descartó la posibilidad de que su detección fuese provocada por una contaminación con sangre o plasma (Kojima y col., 1999). Posteriormente, mediante la técnica de PCR en tiempo real, se demostró la expresión de ghrelin en el tejido cardíaco (sin determinar el tipo celular responsable de su expresión) y otros muchos tejidos, poniendo de manifiesto la amplia distribución tisular de esta hormona (Gananpavan y col., 2004).

Mediante los análisis de expresión génica y proteica realizados en este trabajo demostramos por primera vez que cardiomiocitos tanto de humanos como de ratón expresan y sintetizan ghrelin.

El análisis de la expresión génica (RT-PCR) de ghrelin en la línea HL-1 de ratón se realizó utilizando la secuencia de cebadores descrita por Mori y colaboradores (2000). Estos cebadores son específicos para la secuencia de prepro-ghrelin, previa a la maduración del ARNm de ghrelin, que genera la forma acilada y desacilada del mismo (Mori y col., 2000). Actualmente, se sabe que la secuencia de prepro-ghrelin genera otros péptidos (C-ghrelin y obestatina) además de ghrelin y Des-G (Pemberton y col., 2003; Zhang y col., 2005a). El resultado de la reacción de RT-PCR fue un fragmento de 329 pb correspondiente a la secuencia de prepro-ghrelin, por lo que podemos afirmar que los cardiomiocitos HL-1 expresan ghrelin pero sin poder descartar la posible expresión de C-ghrelin u obestatina. Mediante Southern blot, además del fragmento que se correspondía con la secuencia nucleotídica de ghrelin, se observó la presencia de un fragmento de menor tamaño, aproximadamente 150 pb, de intensidad muy tenue, y que se consideró como una inespecificidad de la reacción. A la vista de los datos publicados por Jeffery y colaboradores (2004), ese fragmento de menor tamaño podría ser la expresión de una nueva variante del transcripto de prepro-ghrelin de la que se

desconoce su importancia fisiológica, y que se genera tras la delección completa del exón 4 del gen de ghrelin (Jeffery y col., 2002; Jeffery y col., 2005).

Una vez determinada la expresión del ARNm de ghrelin en cardiomiocitos, analizamos la síntesis proteica de ghrelin en las células HL-1, en el cultivo primario de cardiomiocitos humanos y en tejido cardíaco: corazón de ratón y corazón de humano. El análisis inmunohistoquímico revela que los cardiomiocitos presentan características de marcaje similares a las células productoras de ghrelin de estómago, y almacenan ghrelin en vesículas citoplasmáticas redondeadas, aunque la señal tiene menor intensidad que la de estómago.

La posibilidad de que estos cardiomiocitos secretasen al medio de cultivo este péptido se analizó mediante radioinmunoensayo, y se comprobó que tanto las células HL-1 como el cultivo primario de cardiomiocitos humanos secretan ghrelin.

Hasta la fecha, existen diversos estudios que demuestran la capacidad de ghrelin para modular la actividad cardiovascular sistémica, modificando parámetros hemodinámicos y metabólicos. Por el contrario, es muy poco lo que se sabe sobre la actividad de ghrelin directa a nivel cardiaco. Por ello, nuestro trabajo se centró en primer lugar en el estudio de la expresión de ghrelin y su receptor en cardiomiocitos y en segundo lugar en el análisis de los efectos de la administración de ghrelin y Des-G sobre la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario. La capacidad de sintetizar y secretar ghrelin al medio de cultivo por parte de los cardiomiocitos humanos y de origen murino sugiere que ghrelin podría actuar de forma autocrina/paracrina en el músculo cardíaco, y con ello contribuir a regular el metabolismo y buen funcionamiento cardíaco a nivel celular.

1.2 Receptor de ghrelin

El receptor de secretagogos de GH (GHS-R) es el receptor natural para ghrelin (Kojima 1999), y se ha descrito su presencia en gran variedad de tejidos, entre los que se encuentra el cardíaco (Ghigo y col., 1999; Muccioli y col., 2000; Ganapavan y col., 2002). En este trabajo se muestra la expresión del GHS-R en la línea celular HL-1 y en cardiomiocitos humanos aislados en cultivo. Los cebadores utilizados para la PCR del GHS-R en la línea HL-1 pertenecen al primer exón, que codifica para las primeras cinco regiones transmembrana presentes en el receptor GHS-R1a (receptor activo) y el GHS-

R1b (inactivo) (McKee y col., 1997), por lo tanto, no podemos discriminar si el receptor que se expresa en las células HL-1 es el receptor tipo 1a o el 1b.

Para el análisis en cardiomiocitos humanos se utilizaron cebadores específicos para la forma activa del receptor GHS-R1a. El producto obtenido, de 329 pb, se correspondía con lo esperado tras utilizar los cebadores descritos por Jeffery y colaboradores (2002).

En los estudios de unión ligando-receptor se observa que ghrelin desplaza eficazmente a su homólogo radiactivo, lo que demuestra que los cardiomiocitos HL-1 presentan sitios de unión específicos para ghrelin. La activación de la ruta clásica de señalización intracelular desencadenada tras la unión de ghrelin a su receptor implica un aumento de la concentración de calcio intracelular (Camiña, 2006). El que la administración de ghrelin en cardiomiocitos HL-1 no active la movilización de calcio intracelular nos permite plantear varias hipótesis:

- El receptor que detectamos mediante RT-PCR en la línea celular HL-1, y al que se une ghrelin, es el receptor GHS-R1b. Aunque no esté descrita su expresión en ratón, debido a que no se ha secuenciado totalmente el gen en esta especie; sí está demostrada su expresión en humano y rata y puede suponerse también en ratón.
- Tras la unión de ghrelin a su receptor GHS-R, éste activa en cardiomiocitos una ruta de señalización intracelular diferente a la ruta clásica.
- Ghrelin se une a un receptor desconocido (distinto al GHS-R) cuya activación no implicaría la movilización de calcio intracelular.

En nuestro estudio, a pesar de que ghrelin desplaza eficientemente a su homólogo radiactivo, la posible presencia de un receptor distinto al clásico cobra fuerza tras los resultados negativos de los estudios de movilización de calcio. Esta afirmación, sin embargo, no puede ser concluyente, debido a que se ha visto muy recientemente que Des-G desencadena movilización de calcio en neuronas para ejercer su efecto sobre la ingesta a pesar de que no se une al receptor clásico GHS-R (Toshinai y col., 2006).

La existencia de un nuevo tipo de receptor de secretagogos, especialmente para los secretagogos peptídicos, comenzó a plantearse tras los estudios realizados por Papotti y colaboradores (2000). El miocardio presenta gran afinidad por la unión del secretagogo peptídico ^{125}I-Tyr-Ala-hexarelina, que es desplazado completamente por su homólogo no radiactivo. No sucedía lo mismo tras la incubación con ghrelin o MK0677, ya que

estos dos compuestos solamente desplazan entre un 11% y un 30% de la unión específica de ^{125}I-Tyr-Ala-hexarelina, lo que sugería la existencia de un receptor que une específicamente GHS peptídicos aunque no es capaz de unir ghrelin (Papotti y col., 2000). El receptor CD36, presente en el tejido cardíaco, fue el receptor capaz de unir GHS peptídicos e incapaz de unir ghrelin, a pesar de su origen peptídico (Bodart y col., 1999).

Tras otros ensayos de unión ligando-receptor y desplazamiento, esta vez en células de cáncer de mama, se propuso la existencia de otro/s receptor/es para ghrelin y los GHS de ambos orígenes. Tres de los datos más importantes que apoyan está propuesta son: a) la presencia de sitios de unión para los GHS, ghrelin y Des-G en líneas celulares que no expresan ARNm de GHS-R1a; b) la capacidad de desplazamiento de la unión específica de ^{125}I-Tyr-Ala-hexarelina por parte de MK0677 y Des-G; y c) la capacidad de Des-G de regular la proliferación celular en células de cáncer de mama (Cassoni y col., 2001).

Recientemente, en otros tipos celulares, también carentes del GHS-R1a, se demostró que tanto ghrelin como Des-G presentan actividad biológica (Baldanzi y col., 2002; Cassoni y col., 2004; Gauna y col., 2004). Por lo tanto, prácticamente se asume ya la existencia de uno o varios receptores diferentes del GHS-R1a, que podrían mediar las acciones de ghrelin y Des-G. Un posible candidato podría haber sido el receptor GPR39 dada su expresión en estómago, intestino e hipotálamo, además de en cardiomiocitos (como se describe en este trabajo), y por tratarse de un receptor huérfano (Nogueiras y Tschöp, 2005). Sin embargo, cabe señalar que en este último año se ha descubierto que el GPR39 es el receptor para obestatina, y los ensayos de competición ligando-receptor descartan la unión de ghrelin al GPR39 (Zhang y col., 2005a).

2. Efecto de ghrelin y Des-G sobre la viabilidad cardiomiocitaria

2.1 Actividad metabólica

El efecto que ejerce ghrelin sobre la proliferación celular es diferente según los tipos célulares analizados. Existen células en las que el tratamiento con ghrelin o Des-G provoca un aumento de la proliferación celular y en otros casos se produce una reducción de la misma (Kojima y Kangawa, 2005). En la línea celular HL-1, ni ghrelin ni Des-G alteran los niveles de actividad metabólica mitocondrial, que además se puede relacionar directamente con proliferación celular.

Contrariamente a nuestros datos, Pettersson y colaboradores (2002) analizaron el efecto de ghrelin y hexarelina sobre la línea cardiomiocitaria H9c2, demostrando que ambos péptidos ejercen un efecto positivo sobre la proliferación celular. Sin embargo, el efecto que provoca la hexarelina sobre la proliferación celular en la línea H9c2 era más claro y pronunciado que el de ghrelin (Pettersson y col., 2002). La posible explicación a estas diferencias podría ser al uso de dosis más altas en la línea H9c2, el tipo de análisis empleado, o el origen embrionario de la línea H9c2, en la que la unión de los secretagogos tiene características diferentes que en cardiomiocitos adultos, como es línea HL-1.

2.2 Apoptosis

En cuanto a la actividad de ghrelin y Des-G sobre la apoptosis celular, en este trabajo se demuestra que la inducción de apoptosis en las células HL-1 provocada por el tratamiento con AraC se previene con el pretratamiento con ghrelin, Des-G o ambos conjuntamente. En el caso de la línea H9c2, el tratamiento con doxorubicina provoca un efecto pro-apoptótico, y de igual forma que en la línea HL-1, la presencia previa de ghrelin o Des-G reduce la apoptosis (Baldanzi y col., 2002). En las células HL-1, ghrelin induce cardioprotección sobre la apoptosis inducida por AraC, y este efecto podría estar mediado por el GHS-R, sin embargo, dado que Des-G también presenta este efecto cardioprotector, y que no se une al GHS-R (Bednarek y col., 2001), este mecanismo podría no implicar a este receptor. Con los datos de la línea H9c2 y los mostrados para la línea HL-1 en este trabajo, se sugiere de nuevo la existencia de uno o más receptores distintos al GHS-R que medien los efectos de ghrelin y Des-G en estos dos tipos celulares cardiomiocitarios.

Ghrelin actúa como regulador en la secreción de GH (Kojima y col., 1999), que a su vez presenta un efecto cardioprotector frente a la inducción de apoptosis por serodeprivación en el cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata (González-Juanatey y col., 2004). Por este motivo nos propusimos analizar la influencia de la administración de GH sobre los niveles de expresión de ghrelin en cardiomiocitos. Los niveles de expresión de ghrelin aumentan significativamente en cardiomiocitos cuando se tratan con GH, por lo que los efectos cardioprotectores de GH bien podrían explicarse, al menos en parte, por una acción indirecta como consecuencia del aumento de los niveles de expresión de ghrelin, que sería el posterior regulador de la ruta anti-apoptótica.

El corazón a lo largo del desarrollo sufre diversos cambios estructurales, determinados por la viabilidad cardiomiocitaria (muerte o regeneración celular), y metabólicos; ambos importantes determinantes de la función cardíaca hasta alcanzar su estado adulto (Saetrum Opgaard y Wang, 2005). Dentro de los cambios estructurales destaca la apoptosis, o muerte celular programada, debido a la pérdida cardiomiocitaria que conlleva (Ritter y col., 2003). La apoptosis es un proceso activo, energéticamente negativo, y ocurre tanto bajo condiciones fisiológicas, crónicas o agudas. En este proceso la célula sufre un encogimiento brusco, aunque la membrana celular permanece intacta y en el núcleo la cromatina primero se condensa para posteriormente romperse originando fragmentos de ADN de, aproximadamente, 185 pb (Freude y col., 1998).

La importancia del proceso de apoptosis es diferente según la edad fisiológica del corazón. Durante el desarrollo, la apoptosis es un proceso fisiológico y esencial, que ocurre de forma normal en la mayoría de los tejidos, y se debe al crecimiento (Ritter y col., 2003). Por el contrario, en la edad adulta la existencia de apoptosis es motivo de alerta. La apoptosis es un proceso muy relevante en lesiones provocadas por isquemia y reperfusión, y en procesos de infarto de miocardio o insuficiencia cardíaca, situaciones en las que se reduce de forma permanente el número de cardiomiocitos (Ritter y col., 2003; Buja; 2005). Esto se ve compensado, en parte, por un incremento del tejido cardíaco a través de un aumento del tamaño de los cardiomiocitos, proceso denominado hipertrofia cardiomiocitaria, y un aumento en el número de fibroblastos que puede desencadenar en fibrosis (Ritter y col., 2003). También existe una compensación aumentando las proteínas de la matriz extracelular (colágeno y fibronectina) (Ritter y col., 2003). A pesar de todo ello, la funcionalidad miocárdica se ve muy afectada (Hein y col., 2000).

La apoptosis está mediada por dos rutas metabólicas centrales: extrínseca, que se activa a través de receptores de membrana, e intrínseca, a través de la activación de mecanismos mitocondriales. Ambas rutas metabólicas están altamente interrelacionadas y su objetivo final es la inactivación de la función mitocondrial y la activación de las caspasas, proteínas que provocan la destrucción de numerosas proteínas celulares reguladoras y estructurales, siendo por lo tanto las ejecutoras de la apoptosis celular (Crow y col., 2004; Baines y Molkentin, 2005). Mecanismos como isquemia y

reperfusión, hipoxia, estrés oxidativo o el uso de fármacos anticancerígenos, alteraciones metabólicas, etc., desencadenan la apoptosis cardiomiocitaria (Crow y col., 2004; Garg y col., 2005). Por el contrario, entre las moléculas que inhiben la apoptosis en cardiomiocitos, cabe destacar a la GH (González-Juanatey y col., 2004) o el IGF-I (Saetrum Opgaard y Wang, 2005), considerados como agentes cardioprotectores. Los resultados presentados por Baldanzi y colaboradores (2002), y los presentados en esta tesis, demuestran que ghrelin y Des-G también actúan como agentes cardioprotectores.

El corazón posee células que no están totalmente diferenciadas, por lo que podrían entrar en ciclo celular y regenerar las zonas en las que se produce la pérdida de cardiomiocitos adultos. No obstante el grado de regeneración de estas células está muy por debajo de la magnitud de la muerte celular presente en la insuficiencia cardíaca, por lo que no pueden llegar a compensar la pérdida de miocitos (Saetrum Opgaard y Wang, 2005). Por ello, la inhibición de la apoptosis es, hoy en día, una de las importantes estrategias para la prevención de la insuficiencia cardíaca.

Se ha sugerido un potencial papel para los GHS peptídicos sobre la prevención frente al daño provocado por el proceso de isquemia y reperfusión durante la cirugía de bypass coronario (Smith, 2005). Visto el efecto anti-apoptótico de ghrelin y Des-G en cardiomiocitos y células endoteliales (Baldanzi y col., 2002; resultados de esta tesis), no se puede descartar el posible potencial terapéutico de ambos péptidos para el tratamiento de patologías cardíacas en las que el daño miocárdico por apoptosis juega un papel primordial.

3. Efecto de ghrelin y Des-G sobre el metabolismo cardiomiocitario

El metabolismo cardiomioctario de lípidos y glucosa es un importante generador de energía en forma de ATP, fundamental para el mantenimiento de la función contráctil (Carley y Severson, 2005). El metabolismo cardíaco está regulado por diversos factores como: la disponibilidad de los sustratos, diversas hormonas (insulina, etc.) y el aporte de oxígeno o la demanda de energía según el esfuerzo físico realizado (Carley y Severson, 2005).

En este trabajo, analizando el metabolismo cardiomiocitario de las células HL-1, encontramos que ghrelin y Des-G, al menos en parte, parecen participar en la regulación el metabolismo cardíaco a través de vías de actuación distintas.

3.1 Efecto de ghrelin y Des-G sobre el metabolismo de lípidos

Mientras que ghrelin por si sólo no parece regular el metabolismo de lípidos en cardiomiocitos HL-1, sí contrarresta el efecto inductor sobre la captación de ácidos grasos que ejerce Des-G en los mismos.

Aunque en las primeras etapas del desarrollo, en condiciones fisiológicas, el sustrato predilecto para los cardiomiocitos es la glucosa, en la etapa adulta, el corazón cambia de preferencia de sustrato a ácidos grasos (Friehs y col., 2003), que generan entre el 60 y 70 % de la energía cardíaca (Carly y Severson, 2005) en esta etapa.

Dado que sobre el 80% del proceso de captación de ácidos grasos por los cardiomiocitos ocurre a través de transportadores (Schaffer y Lodish, 1994), Des-G podría estar regulando alguno de los transportadores implicados en la captación de ácidos grasos y favorecer el metabolismo de lípidos en patologías como la isquemia cardíaca, la diabetes o la insuficiencia cardíaca crónica, en las que se ha demostrado que tanto la captación de los ácidos grasos de cadena larga como su metabolismo están muy alterados (Schaffer y Lodish, 1994).

3.2 Efecto de ghrelin y Des-G sobre el metabolismo de la glucosa

Mientras que ghrelin reduce la captación de glucosa estimulada por la insulina en los cardiomiocitos HL-1 y no afecta a la basal, Des-G no tiene efecto sobre ninguna de ellas. La administración conjunta de ghrelin y Des-G tampoco modifica los valores de captación de glucosa por las células HL-1. En este caso Des-G parece ser quien contrarresta el efecto inhibidor sobre la captación de glucosa inducido por ghrelin en cardiomiocitos.

En otros tipos celulares, ghrelin tiene un efecto contrario al observado en cardiomiocitos HL-1. En adipocitos, además de aumentar la captación de glucosa estimulada por insulina (Kim y col., 2004; Patel y col., 2006), ghrelin incrementa la captación basal de la misma (Kim y col., 2004). Por otro lado, Des-G no presenta ningún efecto sobre la captación de glucosa estimulada por insulina en adipocitos (Patel y col., 2006), al igual que ocurre en cardiomiocitos HL-1.

Curiosamente, sobre adipocitos de tejido adiposo pardo, el pre-tratamiento con ghrelin no tiene efecto sobre la captación basal de glucosa, ni tampoco sobre la estimulada por insulina (Ott y col., 2002).

El punto clave en la captación de la glucosa por parte del miocardio es el paso de la glucosa a través de la membrana plasmática. La glucosa necesita un mecanismo de transporte facilitado, ya que no es permeable a la membrana plasmática de células de mamíferos (Friehs y col., 2005). Importante para ello es la presencia de proteínas transportadoras en el sarcolema. Los cardiomiocitos expresan dos tipos de transportadores que facilitan el paso de la glucosa a través de la membrana: GLUT-1 (activo principalmente en etapas tempranas del desarrollo) y GLUT-4 (transportador regulado por insulina y principal responsable de la captación de glucosa en el miocardio adulto). GLUT-1 se distribuye entre la membrana plasmática y complejos microsomales de baja densidad, mientras que GLUT-4 se almacena mayoritariamente en vesículas intracelulares cercanas al aparato de Golgi y a los endosomas (Friehs y col., 2003).

La interacción de la insulina con su receptor provoca una rápida translocación del transportador GLUT-4 presente en las vesículas intracelulares, que se fusionan con la membrana plasmática, aumentando exponencialmente la captación de glucosa. Tras el estímulo, las moléculas de GLUT-4 se liberan de la membrana plasmática y vuelven a su almacenamiento en las vesículas intracelulares (Friehs y col., 2005).

La insulina puede activar dos rutas metabólicas para inducir la captación de glucosa a través de GLUT-4. La ruta clásica se desencadena tras la unión de la insulina a su receptor, que se autofosforila y fosforila a su vez al sustrato del receptor de insulina tipo 1 (IRS-1), que forma un complejo con el enzima PI3K y activa a la proteína Akt, encargada de promover la translocación de GLUT-4 hacia la membrana plasmática (Saltiel y Kahn, 2001). Dos importantes factores reguladores de la ruta clásica de la insulina son la fosfatasa SHIP2 y PTEN. Ambos factores actúan eliminando los grupos fosfato 5 o 3 del fosfatidilinositol $(3,4,5)P_3$ (PIP_3), respectivamente, sustrato del enzima PI3K, inactivando la ruta de la insulina (Shepherd. 2005). Aparte, parece ser necesaria la activación de una segunda ruta complementaria. Ésta se inicia, igualmente, tras la unión de la insulina a su receptor, que fosforila al protooncogen Cbl que se asocia a la proteína adaptadora CAP. El complejo Cbl-CAP se transloca hacia regiones ricas en lípidos de la membrana plasmática donde regula varios pasos intermediarios hasta la activación de la proteína G TC-10, que envía una segunda señal para la movilización del transportador GLUT-4 a la membrana. (Saltiel y Kahn, 2001).

La resistencia a insulina, definida como la disminución de la capacidad de la insulina de promover la captación de glucosa, está presente en la obesidad y la diabetes

tipo 2 (Caballero, 2003). Se caracteriza por alteraciones en distintos puntos de la ruta metabólica que regula la homeostasis de la glucosa; y resultan ser determinantes la disminución de la concentración del receptor de insulina, la inhibición de la actividad de enzimas intracelulares y la alteración de la translocación de los transportadores de glucosa, entre otros (Satiel y Kahn, 2001). Nuestros resultados proponen un efecto negativo de ghrelin sobre la regulación de la captación de glucosa en cardiomiocitos, lo que podría implicar un empeoramiento en su metabolismo. Este dato está en concordancia con el efecto adipogénico o el aumento de resistencia a insulina demostrado para ghrelin (Tschöp y col., 2000; Broglio y col., 2001). El estudio del papel de ghrelin en la regulación del metabolismo de la glucosa en cardiomiocitos podría resultar fundamental para un mejor conocimiento de la fisiología y fisiopatología cardíaca de situaciones en donde el metabolismo cardiomiocitario sufre una alteración del metabolismo (Abel, 2004). Ejemplo de ello es la isquemia miocárdica, en donde los cardiomiocitos aumentan la tasa de captación y utilización de glucosa, efecto que favorece una mejor recuperación post-isquémica (Friehs y col., 2003).

No obstante, la relación existente entre los niveles plasmáticos de ghrelin y la fisiopatogenia de alteraciones metabólicas relacionadas con el síndrome metabólico no está muy clara. Por ello, se deben tener en cuenta diversos puntos a la hora de analizar la implicación de ghrelin sobre desarrollo del síndrome metabólico.

Por una parte, los niveles plasmáticos de ghrelin están reducidos en obesidad y/o diabetes (Kojima y Kangawa, 2005), lo que podría relacionarse con un aumento del riesgo cardiovascular y de aterotrombosis. Además, se sabe que, a nivel sistémico, ghrelin aumenta la adiposidad y reduce la secreción de insulina, favoreciendo la presencia de diabetes y obesidad (Kojima y Kagawa, 2005). Ambas patologías están englobadas dentro del síndrome metabólico, conjuntamente con otros factores de riesgo cardiovascular como son la hipertensión, dislipemia y recientemente incluidas también alteraciones renales e inflamatorias (Hafidh y col., 2005; Govindarajan y col., 2005). Pero por otro lado, ghrelin modula la respuesta inflamatoria, inhibiendo la producción de citoquinas (Dixit y col., 2004; Li y col., 2004), lo que podría beneficiar factores de riesgos de carácter inflamatorio (obesidad y diabetes tipo 2 y aterotrombosis) implicados en el síndrome metabólico, en la progresión de la enfermedad cardiovascular y en el aumento de la morbilidad y mortalidad poblacional (Govindarajan y col., 2005).

3.3 Efecto de ghrelin y Des-G sobre la ruta intracelular de la insulina

A la vista de los resultados anteriores, nos planteamos un efecto de ghrelin y Des-G sobre la ruta intracelular de la insulina. Otros autores han demostrado previamente que ghrelin es capaz de actuar sobre intermediarios de rutas metabólicas mediadoras de los efectos de la insulina, por ejemplo en células de hepatoma ghrelin regula componentes de la ruta metabólica de la insulina (Murata y col., 2002), en células H9c2 ghrelin y Des-G activan las enzimas PI3K y Akt (Baldanzi y col., 2002), y en adipocitos 3T3 L1 ghrelin aumenta la captación de glucosa a través de PI3K y Akt (Kim y col., 2004).

En primer término analizamos un componente destacado de la ruta de la insulina, la proteína quinasa Akt. Hemos visto que la presencia de insulina en el medio de cultivo induce la fosforilación de Akt, y esta activación es independiente de la combinación con otro tratamiento, incluido ghrelin. Posteriormente, analizamos la fosfatasa PTEN, implicada en la ruta del metabolismo de la glucosa en cardiomiocitos. Aunque su actividad no esté directamente regulada por la insulina, PTEN actúa como fosfatasa encargada de defosforilar PIP_3 y transformarlo en PIP_2. La disminución de los niveles de PIP_3 es como mecanismo de inactivación de la Akt (Harrington y col., 2005). El análisis proteico mediante Western blot indicó que ninguno de los tratamientos realizados provoca cambios significativos en los niveles proteicos de PTEN, por lo que no encontramos relación entre la modulación de ghrelin, Des-G o insulina sobre la captación de glucosa y la concentración proteica de PTEN.

Por tanto, la regulación que ejerce ghrelin sobre la captación de glucosa en cardiomiocitos deberá ocurrir bien con posterioridad a la activación de Akt, o bien en una ruta paralela, implicada en la captación de glucosa en cardiomiocitos, estimulada por la insulina.

4. ¿Son los efectos de ghrelin y Des-G similares o se contraponen?

En la bibliografía existen varios estudios que analizan los efectos de ghrelin y Des-G sobre un mismo sistema o tipo celular. Ghrelin y Des-G comparten efectos sobre la inducción de la ingesta (Toshinai y col., 2006), la inhibición de la lipólisis inducida por isoproterenol en adipocitos de rata (Muccioli y col., 2004), como agentes cardioprotectores en las células H9c2 (Baldanzi y col., 2002), y células HL-1 (resultados presentados en esta tesis) y como reguladores de la proliferación celular (Pettersson y col., 2002; Cassoni y col., 2004). Por otro lado, también se ha demostrado

que poseen diferentes mecanismos de acción. Des-G no regula los efectos neuroendocrinos de ghrelin, pero sí sus efectos metabólicos (Broglio y col., 2004). Ghrelin, en individuos sanos, disminuye los niveles de insulina en plasma y aumenta los de glucosa. Por el contrario, Des-G, administrado conjuntamente con ghrelin, antagoniza los efectos de ghrelin, aunque por sí solo no altera los niveles plasmáticos de insulina o glucosa (Broglio y col., 2004). Otro ejemplo es el trabajo de Gauna y colaboradores (2005), en el que ghrelin estimula de forma dosis y tiempo dependiente la secreción de glucosa por parte de adipocitos, mientras que Des-G la inhibe, además de contrarrestar el efecto ejercido por ghrelin tras su administración conjunta (Gauna y col., 2005). Finalmente, Li y colaboradores (2004) demuestran un efecto anti-inflamatorio por parte de ghrelin en células endoteliales de cordón umbilical HUVECs no compartido por Des-G, sugiriendo que ghrelin actúa a través del GHS-R presente en las células HUVECs (Li y col., 2004).

De todos estos trabajos se podría especular que en aquellos tipos celulares en los que no se ha determinado la presencia del GHS-R1a, pero en los que sí se ha visto efecto de ghrelin y Des-G, ambos péptidos podrían estar compitiendo por su unión al receptor, existiendo dos posibilidades: a) que el sitio de unión sea el mismo y la presencia de uno inhiba la acción del otro, o b) que el sitio de unión sea distinto pero, igualmente, consiga ejercer un efecto inhibidor frente al otro. No obstante, es necesario un estudio más detallado de los mecanismos de unión de ghrelin y Des-G a su receptor o receptores y de las rutas de señalización intracelular activadas por ambos para determinar las posibles interacciones entre ambos péptidos.

5. Papel de la obestatina sobre la viabilidad y metabolismo cardiomiocitario

La obestatina, aunque deriva del mismo gen que ghrelin, presenta funciones opuestas a éste en cuanto la regulación de la ingesta y movilidad gastrointestinal (Zhang y col., 2005).

En este trabajo hemos demostrado que los cardiomiocitos HL-1 poseen receptores para la obestatina (GPR39), pero ésta parece no participar en la regulación del metabolismo de la glucosa o ácidos grasos en cardiomiocitos, aunque sí induce una reducción de la actividad metabólica mitocondrial. Esto demuestra un efecto directo de la obestatina, posiblemente a través del receptor GPR39, sobre los cardiomiocitos HL-1.

La reducción de la actividad metabólica que provoca la obestatina en los cardiomiocitos podría ser consecuencia de un aumento en los niveles de apoptosis

celular o una disminución de la proliferación celular. Sin embargo, el tratamiento con obestatina no modifica los niveles basales de apoptosis de nuestras células, lo que sugiere un papel más específico de este péptido, posiblemente sobre las mitocondrias u otros órganos como lisosomas o endosomas, también capaces de metabolizar el compuesto MTT (Hynes y col., 2005) utilizado para este estudio, cuya transformación depende de la actividad redox de la célula, siendo reflejo de la función mitocondrial, y que se utiliza como indicador del estado metabólico de la célula (Hynes y col., 2005), y como medida indirecta de la viabilidad o proliferación celular (Takahashi y col., 2002).

6. Resumen

En resumen, demostramos que los cardiomiocitos expresan, sintetizan y secretan ghrelin. Asimismo, demostramos la existencia de sitios de unión específica para ghrelin y obestatina en la línea cardiomiocitaria de ratón HL-1. El análisis de la actividad de ghrelin y de Des-G sobre la viabilidad celular y el metabolismo cardíaco muestran que ambos presentan actividad cardioprotectora, en cambio, existen divergencias en cuanto a sus efectos sobre el metabolismo de lípidos y glucosa. Por su parte, la obestatina reduce la actividad metabólica mitocondrial de los cardiomiocitos sin que esto sea consecuencia de una modificación en la viabilidad de las células o el metabolismo de la glucosa o de lípidos.

El corazón, además de estar regulado por señales endocrinas procedentes de otros órganos (adrenal, riñón, etc.), es capaz de responder a señales autocrinas/paracrinas generadas por el mismo (por ejemplo péptidos natriuréticos). Los resultados de este trabajo sugieren que podría existir un sistema autocrino/paracrino de la regulación de la viabilidad y metabolismo cardiomiocitario por parte de ghrelin que, junto a los efectos beneficiosos de este péptido a nivel sistémico sobre los parámetros hemodinámicos, sería fundamental para el mantenimiento de la funcionalidad del sistema cardiovascular.

Conclusiones

1. Los cardiomiocitos humanos y de ratón son capaces de sintetizar y secretar ghrelin, y presentan sitios de unión específicos para este péptido.

2. Ghrelin y Des-G comparten un papel protector en cardiomiocitos frente a procesos inductores de la apoptosis en estas células. Además, los niveles de expresión génica de ghrelin están regulados por procesos pro y anti-apoptóticos.

3. Ghrelin y Des-G regulan de manera diferencial el metabolismo de glucosa y lípidos en cardiomiocitos.

4. El receptor de obestatina GPR39 se expresa en cardiomiocitos. La obestatina, a pesar de que no regula ni el metabolismo de la glucosa y lípidos, ni la viabilidad de cardiomiocitos, sí ejerce un efecto inhibidor sobre la actividad metabólica mitocondrial en estas células.

Bibliografía

1. **Abel ED**. Glucose transport in the heart. *Front Biosci*. 2004; 9:201-15.
2. **Anderson LL, Jeftinija S, Scanes CG, Stromer MH, Lee JS, Jeftinija K, Glavaski-Joksimovic A.** Physiology of ghrelin and related peptides. *Domest Anim Endocrinol*. 2005; 111-44.
3. **Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K**. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*. 2005; 146:355-64.
4. **Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K**. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:4753-8.
5. **Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M**. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl-ghrelin. *Gut*. 2005; 54:18-24.
6. **Baiguera S, Conconi MT, Guidolin D, Mazzocchi G, Malendowicz LK, Parnigotto PP, Spinazzi R, Nussdorfer GG**. Ghrelin inhibits *in vitro* angiogenic activity of rat brain microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med.* 2004; 14:849-54.
7. **Baines CP, Molkentin JD**. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38:47-62.
8. **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; 159:1029-37.
9. **Banks WA, Tschop 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.
10. **Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, Aguilar E, Diéguez C, Toppari J, Tena-Sempere M**. Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells *in vivo* and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology*. 2004; 145:4825-34.
11. **Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, Keen JN, Bouloux PM, Mikhailidis DP, Bruckdorfer KR, Vanderpump MP, Srai KS**. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem.* 2003; 278:8877-80.
12. **Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghe C, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G**. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-

octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol*. 2003; 476:87-95.

13. **Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV**. Structure-function studies on the new growth hormone releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem*. 2000; 43:4370-6.
14. **Bennett PA, Thomas GB, Howard AD, Feighner SD, van der Ploeg LH, Smith RG, Robinson IC**. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology*. 1997; 138:4552-7.
15. **Bizzarri C, Rigamonti AE, Giannone G, Berardinelli R, Cella SG, Cappa M, Muller EE**. Maintenance of a normal meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in children with Prader-Willi syndrome. *Horm Metab Res*. 2004, 36:164-169.
16. **Bodart V, Bouchard JF, McNicoll N, Escher E, Carriere P, Ghigo E, Sejlitz T, Sirois MG, Lamontagne D, Ong H**. Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res*. 1999; 85:796-802.
17. **Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H.** CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*. 2002; 90:844-9.
18. **Briatore L, Andraghetti G, Cordera R**. Acute plasma glucose increase, but not early insulin response, regulates plasma ghrelin. *Eur J Endocrinol*. 2003; 149:403-6.
19. **Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E**. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:5083-6.
20. **Broglio F, Benso A, Gottero C, Prodam F, Grottoli S, Tassone F, Maccario M, Casanueva FF, Diéguez C, Deghenghi R, Ghigo E, Arvat E**. Effects of glucose, free fatty acids or arginine load on the GH-releasing activity of ghrelin in humans. *Clin Endocrinol*. 2002; 57:265-71.
21. **Broglio F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Abribat T,Van Der Lely AJ, Ghigo E**. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:3062-5.
22. **Buja LM.** Myocardial ischemia and reperfusion injury**.** *Cardiovasc Pathol.* 2005; 14:170-5.
23. **Caballero AE**. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease*. Obes Res*. 2003; 11:1278-89.
24. **Camiña JP**. Cell biology of the ghrelin receptor.*J Neuroendocrinology*.2006; 18:65-76.

25. **Cao JM, Ong H, Chen C**. Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab*. 2006; 17:13-18.
26. **Carley AN, Severson DL**. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1734:112-26.
27. **Carpino PA**. Growth hormone secretagogues. *IDrugs*. 1999; 2:1302-12.
28. **Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G**. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol*. 2004; 150:173-84.
29. **Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G**. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:1738-45.
30. **Chang L, Zhao J, Li GZ, Geng B, Pan CS, Qi YF, Tang CS**. Ghrelin protects myocardium from isoproterenol-induced injury in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2004a; 25:1131-7.
31. **Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, Weintraub NL, Tang CS**. Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004b; 43: 165-170.
32. **Chanoine JP, Wong AC**. Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting. *Endocrinology*. 2004; 145:3813-20.
33. **Chapman IM, Bach MA, Van Cauter E, Farmer M, Krupa D, Taylor AM, Schilling LM, Cole KY, Skiles EH, Pezzoli SS, Hartman ML, Veldhuis JD, Gormley GJ and Thorner MO**. Stimulation of the growth hormone-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretogogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *J. Clin Endocrinol Metab*. 1996; 4249-57.
34. **Chen C, Wu D, Clarke IJ**. Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol*. 1996; 148:381-6.
35. **Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N, Fujimiya M**. Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology*. 2005; 129:8-25.
36. **Choe YH, Song SY, Paik KH, Oh YJ, Chu SH, Yeo SH, Kwon EK, Kim EM, Rha MY, Jin DK**. Increased density of ghrelin expressing cells in the gastric fundus and body in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:5441-5.
37. **Colao A, Marzullo P, Di Somma C, Lombardi G.** Growth hormone and the heart. *Clin Endocrinol*. 2001; 54:137-54.

38. **Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K**. Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas*. 2003; 27:161-6.
39. **Conconi MT, Nico B, Guidolin D, Baiguera S, Spinazzi R, Rebuffat P, Malendowicz LK, Vacca A, Carraro G, Parnigotto PP, Nussdorfer GG, Ribatti D**. Ghrelin inhibits FGF-2-mediated angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Peptides*. 2004; 25:2179-85.
40. **Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL**. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003; 37:649-61.
41. **Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN.** The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. 2004; 95:957-70.
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. **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.
44. **Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M**. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000; 141:4255-61.
45. **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*. 2002a; 51:124-9.
46. **Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M**. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 2002b; 123:1120-8.
47. **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: 904-7.
48. **DelParigi A, Tschop M, Heiman ML, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM, Bunt JC, Tataranni PA**. High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:5461-4.

49. **Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R, Ong H**. Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J*. 2004; 382:417-24.
50. **Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW Jr, Taub DD.** Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest*. 2004; 114:57-66.
51. **Djurhuus CB, Hansen TK, Gravholt C, Orskov L, Hosoda H, Kangawa K, Jorgensen JO, Holst JJ, Schmitz O**. Circulating levels of ghrelin and GLP-1 are inversely related during glucose ingestion. *Horm Metab Res*. 2002; 34:411-3.
52. **Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J**. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol*. 2002; 146:241-4.
53. **Englander EW, Gomez GA, Greeley GH Jr**. Alterations in stomach ghrelin production and in ghrelin-induced growth hormone secretion in the aged rat. *Mech Ageing Dev*. 2004; 125:871-5.
54. **Enomoto M, Nagaya N, Uematsu M, Okumura H, Nakagawa E, Ono F, Hosoda H, Oya H, Kojima M, Kanmatsuse K, Kangawa K.** Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. *Clin Sci*. 2003; 105:431-5.
55. **Fischer U, Schulze-Osthoff K**. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev*. 2005; 57:187-215.
56. **Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS**. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 284:313-6.
57. **Frascarelli S, Ghelardoni S, Ronca-Testoni S, Zucchi R**. Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart. *Basic Res Cardiol*. 2003; 98:401-5.
58. **Freude B, Masters TN, Kostin S, Robicsek F, Schaper J**. Cardiomyocyte apoptosis in acute and chronic conditions. *Basic Res Cardiol*. 1998; 93:85-9.
59. **Friehs I, Cao-Danh H, Nathan M, McGowan FX, del Nido PJ**. Impaired insulin-signaling in hypertrophied hearts contributes to ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331:15-22.
60. **Friehs I, Cao-Danh H, Stamm C, Cowan DB, McGowan FX, del Nido PJ.** Postnatal increase in insulin-sensitive glucose transporter expression is associated with improved recovery of postischemic myocardial function. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 126:263-71.
61. **Garg S, Narula J, Chandrashekhar Y.** Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38:73-9.
62. **Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJ, Ghigo E, van**

der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:1055-60.

63. **Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJ, Abribat T, van Koetsveld P, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ**. Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:5035-42.
64. **Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M**. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:400-9.
65. **Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M**. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:879-87.
66. **Ghè C, Cassoni P, Catapano F, Marrocco T, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M**. The antiproliferative effect of synthetic peptidyl GH secretagogues in human CALU-1 lung carcinoma cells. *Endocrinology*. 2002; 143:484-91.
67. **Ghigo E, Arvat E, Broglio F, Giordano R, Gianotti L, Muccioli G, Papotti M, Graziani A, Bisi G, Deghenghi R, Camanni F**. Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. *Horm Res*. 1999; 51:9-15.
68. **Ghigo E, Arvat E, Gianotti L, Imbimbo BP, Lenaerts V, Deghenghi R, Camanni F**. Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78:693-8.
69. **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; 87:2988.
70. **Goldstone AP, Patterson M, Kalingag N, Ghatei MA, Brynes AE, Bloom SR,Grossman AB, Korbonits M**. Fasting and postprandial hyperghrelinemia in Prader-Willi syndrome is partially explained by hypoinsulinemia, and is not due to peptide YY3-36 deficiency or seen in hypothalamic obesity due to craniopharyngioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:2681-90.
71. **González-Juanatey JR, Piñeiro R, Iglesias MJ, Gualillo O, Kelly PA, Diéguez C, Lago F**. GH prevents apoptosis in cardiomyocytes cultured *in vitro* through a calcineurin-dependent mechanism. *J Endocrinol*. 2004; 180:325-35.
72. **Govindarajan G, Whaley-Connell A, Mugo M, Stump C, Sowers JR.** The

cardiometabolic syndrome as a cardiovascular risk factor. *Am J Med Sci.* 2005; 330:311-8.

73. **Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Diéguez C, Casanueva F**. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology*. 2001; 142:788-94.
74. **Hafidh S, Senkottaiyan N, Villarreal D, Alpert MA.** Management of the metabolic syndrome. *Am J Med Sci*. 2005; 330:343-51.
75. **Haqq AM, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, Weigle DS, Frayo RS, LaFranchi SH, Cummings DE, Purnell JQ**. Circulating ghrelin levels are suppressed by meals and octreotide therapy in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:3573-3576.
76. **Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF**. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30:35-42.
77. **Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K**. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:4552.
78. **Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Murakami N**. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol*. 2002; 173:239-45.
79. **Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J**. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000; 45:273-8.
80. **Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM, Schwartz TW**. Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem*. 2004; 279:53806-17.
81. **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; 279:909-13.
82. **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: 1995-2000.
83. **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.
84. **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, Van der Ploeg LH, et al**. A

receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996; 273:974-7.

85. **Hynes J, Hill R, Papkovsky DB**. The use of a fluorescence-based oxygen uptake assay in the analysis of cytotoxicity. *Toxicology in vitro.* 2005. En prensa.
86. **Inui A**. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2:551-60.
87. **Jarkovska Z, Krsek M, Rosicka M, Marek J**. Endocrine and metabolic activities of a recently isolated peptide hormone ghrelin, an endogenous ligand of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocr Regul*. 2004; 38:80-6.
88. **Jeffery PL, Duncan RP, Yeh AH, Jaskolski RA, Hammond DS, Herington AC, Chopin LK**. Expression of the ghrelin axis in the mouse: an exon 4-deleted mouse proghrelin variant encodes a novel C terminal peptide. *Endocrinology*. 2005; 146:432-40.
89. **Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK**. Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol*. 2002; 172:7-11.
90. **Kamegai J, Tamura H, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I.** Thyroid hormones regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J Neuroendocrinol*. 2001a; 13:275-278.
91. **Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I**. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*. 2001b; 50:2438-43.
92. **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.
93. **Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP**. [^{125}I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherscleros is. *Br J Pharmacol*. 2001; 134:143-9.
94. **Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS**. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2004; 18:2291-301.
95. **Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, Han BH, Kim MS, Shin CS, Kim SY**. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone*. 2005; 37:359-69.
96. **King MK, Gay DM, Pan LC, McElmurray JH 3rd, Hendrick JW, Pirie C, Morrison A, Ding C, Mukherjee R, Spinale FG**. Treatment with a growth hormone secretagogue in a model of developing heart failure: effects on ventricular and myocyte

function. *Circulation*. 2001; 103:308-13.

97. **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.
98. **Kojima M, Kangawa K**. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005; 85:495-522.
99. **Konturek PC, Konturek JW, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek PC**. Neuro-hormonal control of food intake; basic mechanisms and clinical implications. *J Physiol Pharmacol*. 2005; 56:5-25.
100. **Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB**. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 186:881-7.
101. **Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB**. Ghrelin a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*. 2004; 25:27-68.
102. **Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM**. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology*. 2002; 143:155-62.
103. **Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr**. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*. 2002; 143:185-90.
104. **Leonetti F, Iacobellis G, Ribaudo MC, Zappaterreno A, Tiberti C, Iannucci CV, Vecci E, Di Mario U**. Acute insulin infusion decreases plasma ghrelin levels in uncomplicated obesity. *Regul Pept*. 2004; 122:179-83.
105. **Levin F, Edholm T, Ehrstrom M, Wallin B, Schmidt PT, Kirchgessner AM, Hilsted LM, Hellstrom PM, Naslund E**. Effect of peripherally administered ghrelin on gastric emptying and acid secretion in the rat. *Regul Pept*. 2005; 131:59-65.
106. **Li WG, Gavrila D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, McCormick ML, Sigmund CD, Tang C, Weintraub NL**. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation*. 2004; 109:2221-6.
107. **Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, Kagiyama S, Fujii K, Iida M**. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension*. 2004; 43:977-82.
108. **Locatelli V, Rossoni G, Schweiger F, Torsello A, De Gennaro Colonna V, Bernareggi M, Deghenghi R, Muller EE, Berti F**. Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology*. 1999; 140:4024-31.
109. **Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M,**

Kojima M, Kangawa K, Shioda S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett*. 2002; 22; 321:157-60.

110. **Lucidi P, Murdolo G, Di Loreto C, Parlanti N, De Cicco A, Ranchelli A, Fatone C, Taglioni C, Fanelli C, Santeusanio F, De Feo P.** Meal intake similarly reduces circulating concentrations of octanoyl and total ghrelin in humans. *J Endocrinol Invest*. 2004; 27:12-5.
111. **Marleau S, Mulumba M, Lamontagne D, Ong H**. Cardiac and peripheral actions of growth hormone and its releasing peptides: relevance for the treatment of cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*. 2006; 69:26-35.
112. **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; 276:905-8.
113. **Matsumura K, Tsuchihashi T, Fujii K, Abe I, Iida M**. Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. *Hypertension*. 2002; 40:694-9.
114. **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; 11:415-23.
115. **Mohlig M, Spranger J, Otto B, Ristow M, Tschop M, Pfeiffer AF.** Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol Invest*. 2002; 25:36-8.
116. **Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K**. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone *in vitro*. *Endocrinology*. 1981; 108:31-9.
117. **Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara a, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K**. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett*. 2000; 486:213-6.
118. **Muccioli G, Broglio F, Valetto MR, Ghe C, Catapano F, Graziani A, Papotti M, Bisi G, Deghenghi R, Ghigo E**. Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. *Ann Endocrinol*. 2000; 61:27-31.
119. **Muccioli G, Papotti M, Locatelli V, Ghigo E, Deghenghi R**. Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest*. 2001; 24:7-9.
120. **Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E**. Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol*. 2004; 498:27-35.
121. **Munson PJ, Rodbard D**. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem*. 1980; 107:220-39.

122. **Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K**. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem*. 2002; 277:5667-74.

123. **Murdolo G, Lucidi P, Di Loreto C, Parlanti N, De Cicco A, Fatone C, Fanelli CG, Bolli GB, Santeusanio F, De Feo P**. Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes*. 2003; 52:2923-7.

124. **Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K**. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001a; 280:1483-7.

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

126. **Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, Hosoda H, Shimizu W, Yamagishi M, Oya H, Koh H, Yutani C, Kangawa K**. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation*. 2001c; 104:2034-8.

127. **Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K**. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure .*Circulation*. 2001d; 104:1430-5.

128. **Nagaya N, Kangawa K**. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol*. 2003a; 3:146-51.

129. **Nagaya N, Kangawa K**. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regul Pept.* 2003b; 114:71-7.

130. **Nakai N, Kaneko M, Nakao N, Fujikawa T, Nakashima K, Ogata M, Tanaka M**. Identification of promoter region of ghrelin gene in human medullary thyroid carcinoma cell line. *Life Sci*. 2004; 75:2193-201.

131. **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.

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

133. **Nicholls RD, Knepper JL.** Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001; 2:153-75.

134. **Nogueiras R, Tschop M**. Biomedicine. Separation of conjoined hormones yields

appetite rivals. *Science*. 2005; 310:985-6.

135. **Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, Perwitz N, Klein HH, Tschop M, Klein J.** Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res.* 2002; 34:640-5.
136. **Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M**. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*. 2001; 145:669-73.
137. **Otto B, Tschop M, Fruhauf E, Heldwein W, Fichter M, Otto C, Cuntz U**. Postprandial ghrelin release in anorectic patients before and after weight gain. *Psychoneuroendocrinology*. 2005; 30:577-81.
138. **Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G**. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:3803-7.
139. **Parhar IS, Sato H, Sakuma Y**. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305:169-75.
140. **Patel AD, Stanley SA, Murphy KG, Frost GS, Gardiner JV, Kent AS, White NE, Ghatei MA, Bloom SR.** Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regul Pept.* 2006; 134:17-22.
141. **Pemberton C, Wimalasena P, Yandle T, Soule S, Richards M**. C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 310:567-73.
142. **Pettersenn S, Rasch AC, Penshorn M, Beil FU, Schulte HM**. Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*. 2001; 142:2649-59.
143. **Pettersson I, Muccioli G, Granata R, Deghenghi R, Ghigo E, Ohlsson C, Isgaard J**. Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. *J Endocrinol*. 2002; 175:201-9.
144. **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.
145. **Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L.** Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:2924-9.
146. **Rauma J, Spangeus A, El-Salhy M**. Ghrelin cell density in the gastrointestinal tracts of animal models of human diabetes. *Histol Histopathol*. 2006; 21:1-5.
147. **Reimer MK, Pacini G, Ahren B**. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2003; 144:916-21.
148. **Rindi G, Necchi V, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, Raimondo F, Cocchi**

D, Solcia E. Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol*. 2002; 117:511-9.

149. **Ritter O, Neyses L**. The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol Med*. 2003; 9:313-21.
150. **Rossoni G, De Gennaro Colonna V, Bernareggi M, Polvani GL, Muller EE, Berti F.** Protectant activity of hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998; 32:260-5.
151. **Saetrum Opgaard O, Wang PH**. IGF-I is a matter of heart. *Growth Horm IGF Res*. 2005; 15:89-94.
152. **Saltiel AR, Kahn CR**. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414:799-806.
153. **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; 146:2510-6.
154. **Schaffer JE, Lodish HF**. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. 1994; 79:427-36.
155. **Schaller G, Schmidt A, Pleiner J, Woloszczuk W, Wolzt M, Luger A**. Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes*. 2003; 52:16-20.
156. **Seoane LM, Lopez M, Tovar S, Casanueva FF, Senaris R, Diéguez C**. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 2003; 144:544-51.
157. **Shanado Y, Kometani M, Uchiyama H, Koizumi S, Teno N**. Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325:1487-94.
158. **Shepherd PR**. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand*. 2005; 183:3-12.
159. **Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S**. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:240-4.
160. **Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N**. Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res*. 2003a; 9:774-8.
161. **Shimizu Y, Nagaya N, Teranishi Y, Imazu M, Yamamoto H, Shokawa T, Kangawa K, Kohno N, Yoshizumi M**. Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003b; 310:830-5.

162. **Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I**. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest*. 2002; 109: 1429-36.

163. **Sibilia V, Pagani F, Guidobono F, Locatelli V, Torsello A, Deghenghi R, Netti C**. Evidence for a central inhibitory role of growth hormone secretagogues and ghrelin on gastric acid secretion in conscious rats. *Neuroendocrinology*. 2002; 75:92-7.

164. **Sibilia V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, Campanini N, Deghenghi R, Netti C**. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology*. 2003; 144:353-9.

165. **Simonsson M, Eriksson S, Hakanson R, Lind T, Lonroth H, Lundell L, O'Connor DT, Sundler F**. Endocrine cells in the human oxyntic mucosa. A histochemical study. *Scand J Gastroenterol*. 1988; 23:1089-99.

166. **Smith RG, Pong SS, Hickey G, Jacks T, Cheng K, Leonard R, Cohen CJ, Arena JP, Chang CH, Drisko J, Wyvratt M, Fisher M, Nargund R, Patchett A**. Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Recent Prog Horm Res*. 1996; 51:261-85.

167. **Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ Jr, Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA**. Peptido mimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev*. 1997; 18:621-45.

168. **Smith RG**. Development of growth hormone secretagogues. *Endocr Rev*. 2005; 26:346-60.

169. **Spranger J, Ristow M, Otto B, Heldwein W, Tschop M, Pfeiffer AF, Mohlig M**. Post-prandial decrease of human plasma ghrelin in the absence of insulin. *J Endocrinol Invest*. 2003; 26:19-22.

170. **Sun Y, Ahmed S, Smith RG**. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol*. 2003; 23:7973-81.

171. **Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG**. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:4679-84.

172. **Takahashi S, Abe T, Gotoh J, Fukuuchi Y**. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry International* 2002; 40: 441-448.

173. **Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K**. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:4908-11.

174. **Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Kineman RD, Frohman LA, Wakabayashi I**.

Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J Neuroendocrinol*. 2000; 12:481-5.

175. **Tanaka M, Hayashida Y, Nakao N, Nakai N, Nakashima K**. Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1522:62-5.
176. **Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S**. Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol*. 2002; 146:1-3.
177. **Tivesten A, Bollano E, Caidahl K, Kujacic V, Sun XY, Hedner T, Hjalmarson A, Bengtsson BA, Isgaard J**. The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology*. 2000; 141:60-6.
178. **Tomasetto C, Wendling C, Rio MC, Poitras P**. Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus. *Peptides*. 2001; 22:2055-9.
179. **Toogood AA, Shalet SM**. Ageing and growth hormone status. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998; 12:281-96.
180. **Torsello A, Ghe' C, Bresciani E, Catapano F, Ghigo E, Deghenghi R, Locatelli V, Muccioli G**. Short ghrelin peptides neither displace ghrelin binding *in vitro* nor stimulate GH release *in vivo*. *Endocrinology*. 2002; 143:1968-71.
181. **Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S**. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281:1220-5.
182. **Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M**. Des-acyl Ghrelin Induces Food Intake by a Mechanism Independent of the Growth Hormone Secretagogue Receptor. *Endocrinology*. 2006. En prensa.
183. **Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML**. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000; 407: 908-13.
184. **Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C**. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2001a; 24:19-21.
185. **Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML**. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001b; 50:707-9.
186. **Tsubota Y, Owada-Makabe K, Yukawa K, Maeda M**. Hypotensive effect of des-acyl ghrelin at nucleus tractus solitarii of rat. *Neuroreport*. 2005; 16:163-6.
187. **Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M**. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor

growth. *Am J Pathol*. 2003; 162:645-54.

188. **Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M**. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:1300-8.
189. **Wei W, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley GH Jr**. Characterization and regulation of the rat and human ghrelin promoters. *Endocrinology*. 2005; 146:1611-25.
190. **Wierup N, Sundler F**. Ultrastructure of islet ghrelin cells in the human fetus. *Cell Tissue Res*. 2005; 319:423-8.
191. **Wiley KE, Davenport AP**. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol*. 2002; 136:1146-52.
192. **Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM**. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology*. 2003; 144:5184-7.
193. **Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW**. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101:8227-32.
194. **Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR**. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001a; 86:5992.
195. **Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR**. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*. 2001b; 50:2540-7.
196. **Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M, Yahata K, Suganami T, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K**. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13:2748-52.
197. **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*. 2005a; 310:996-9.
198. **Zhang W, Hu Y, Lin TR, Fan Y, Mulholland MW**. Stimulation of neurogenesis in rat nucleus of the solitary tract by ghrelin. *Peptides*. 2005b; 26:2280-8.
199. **Zhang W, Lin TR, Hu Y, Fan Y, Zhao L, Stuenkel EL, Mulholland MW.** Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol*. 2004a; 559:729-37.
200. **Zhang W, Zhao L, Lin TR, Chai B, Fan Y, Gantz I, Mulholland MW**. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell*. 2004b; 15:2484-91.