



Role of glucose-dependent insulinotropic peptide in the nutritional programming of metabolic syndrome

Title in Spanish: *Papel del péptido insulínico dependiente de glucosa en la programación nutricional del síndrome metabólico*

Juan de Toro Martín^{1*}, Elisa Fernández Millán^{2,3}, Esther Lizárraga Mollinedo², Fernando Escrivá Pons^{2,3}, Carmen Álvarez Escolá^{2,3}

¹Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM).

ABSTRACT: Early nutritional restriction has been associated with increased incidence of metabolic syndrome-associated pathologies in adulthood. However, the underlying mechanisms that determine the development of these diseases are not yet fully known. In the present work, we explored the relevance of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) in the development of these pathologies in a model of Wistar rats. Two groups of dams were fed *ad libitum* (C) or food-restricted (U) during pregnancy and suckling. At that time, rats were re-fed a high-fat diet (HFD; CHF and UHF) for 22 weeks. Both male and female UHF rats showed an obese phenotype characterized by hyperphagia, visceral fat accumulation and adipocyte hypertrophy, which was more pronounced than in CHF rats. Oral glucose tolerance tests showed that female UHF rats experienced glucose intolerance, insulin hypersecretion and an exacerbated GIP secretion. Administration of the GIP receptor antagonist, (Pro3)GIP, to UHF female rats markedly reduced visceral fat mass and adipocyte hypertrophy, and these changes were accompanied by improvement of glucose tolerance and insulin sensitivity. In conclusion, the exacerbated production and secretion of GIP seems to represent the stimulus for insulin hypersecretion and insulin resistance shown by UHF female rats, suggesting that GIP may play a critical role in the development of metabolic disturbances related to nutritional rehabilitation.

RESUMEN: La restricción nutricional precoz ha sido asociada con una mayor incidencia de patologías relacionadas con el síndrome metabólico durante la edad adulta. Sin embargo, los mecanismos subyacentes que determinan el desarrollo de dichas patologías aún no se conocen en su totalidad. En el presente trabajo, se analizó el papel del péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) en el desarrollo de dichas patologías en un modelo de rata Wistar. Las ratas gestantes fueron alimentadas *ad libitum* (C) o sometidas a restricción nutricional (S) durante el embarazo y la lactancia, al final de la cual las crías fueron realimentadas con dieta grasa (CR, SR) durante 22 semanas. Tanto los machos como las hembras SR mostraron un fenotipo obesogénico caracterizado por hiperfagia, acumulación de grasa visceral e hipertrofia adipocitaria, de manera más pronunciada que la población CR. Los test de tolerancia oral a la glucosa mostraron que las hembras SR experimentaron intolerancia a la glucosa e hipersecreción de insulina y GIP. La administración del antagonista del receptor de GIP, (Pro3)GIP, a las hembras SR dio lugar a una significativa reducción del tejido adiposo y del tamaño adipocitario, junto a una mejora de la tolerancia a la glucosa y de la sensibilidad a la insulina. En conclusión, la exacerbada secreción de GIP parece representar el estímulo para la hipersecreción de insulina y el desarrollo de resistencia a la misma en las hembras SR, lo que sugiere que GIP jugaría un papel esencial en el desarrollo de alteraciones metabólicas asociadas a la rehabilitación nutricional.

*Corresponding Author: juandetoromartin@gmail.com

Received: October 7, 2015 Accepted: June 20, 2016

Premio Juan Abelló del Concurso Científico 2015 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 185-199

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La restricción nutricional durante etapas críticas del desarrollo ha sido asociada al desarrollo de patologías relacionadas con el síndrome metabólico durante la edad adulta, como la obesidad y la diabetes tipo 2. Esta relación ha sido previamente puesta de manifiesto en diferentes estudios epidemiológicos en humanos (1,2), así como en modelos de experimentación animal (3,4). Asimismo, se

ha descrito que una realimentación con dieta grasa induce un empeoramiento del perfil lipídico, así como un deterioro de la homeostasis glucídica, de manera más acusada en individuos sometidos a restricción nutricional precoz que en aquellos no sometidos a ningún tipo de restricción nutricional durante etapas del desarrollo (5). Sin embargo, los mecanismos subyacentes que determinan la aparición de dichas patologías aún no se conocen en su

totalidad. En este sentido, aún son escasos los estudios encaminados a dilucidar el papel del eje entero-insular en la regulación de la homeostasis glucídica y nutricional, así como en las adaptaciones metabólicas que tienen lugar durante la rehabilitación nutricional.

El eje entero-insular representa una red de comunicaciones neuronales, endocrinas y nutricionales entre el tracto gastrointestinal y páncreas endocrino. Entre los péptidos secretados desde el epitelio intestinal se encuentra el denominado péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), secretado por las células K en respuesta a la ingesta de nutrientes (6), principalmente glucosa y grasas (7), y capaz de incrementar la secreción de insulina estimulada por glucosa (8). Este efecto, conocido como efecto incretina, se basa en el hecho de que una administración oral de glucosa es capaz de inducir un incremento mucho mayor (entre un 50 y un 70%) de los niveles plasmáticos de insulina en comparación con la misma cantidad de glucosa administrada por vía intravenosa (9,10), debido a la activación del receptor de GIP en las células β pancreáticas, estimulando finalmente la exocitosis de los gránulos de insulina (11). Además de potenciar la secreción de insulina en humanos y roedores, GIP estimula la biosíntesis de insulina, induciendo la expresión del gen de proinsulina, y la expresión de las proteínas implicadas en la detección de glucosa por la célula β , como el transportador de glucosa GLUT-1 y la hexoquinasa 1 (12). Asimismo, estudios en ratones con una delección específica del receptor de GIP en los islotes pancreáticos han puesto de manifiesto la capacidad de GIP para estimular la proliferación e inhibir la apoptosis de las células β (13).

A nivel extrapancreático, las acciones más relevantes de GIP tienen lugar en el tejido adiposo, promoviendo diferentes procesos anabólicos como la síntesis de ácidos grasos, la lipogénesis mediada por insulina, la síntesis de la lipoproteína lipasa (LPL) y reduciendo la lipólisis mediada por glucagón (8). Por tanto, GIP tiene un destacado papel en el metabolismo lipídico y en el desarrollo de obesidad.

La producción y secreción de GIP parece estar coordinada con el estatus nutricional, ya que se ha observado que dietas ricas en grasa aumentan el número de células K, así como la expresión y los niveles circulantes de GIP (14,15). Asimismo, se ha descrito que la secreción de GIP tras una sobrecarga oral de glucosa aumenta si existe una exposición previa a una dieta grasa, hecho que podría contribuir a la hiperinsulinemia que presentan individuos obesos con resistencia a la insulina (16). Aunque la señalización de GIP en los adipocitos no resulta esencial en condiciones de sensibilidad normal a la insulina, sí parece ser indispensable en la efectiva acumulación de lípidos tras una alimentación con dieta grasa (17). En este sentido, el tratamiento farmacológico con análogos de GIP da lugar a un aumento de la actividad LPL y de la acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo en ratas diabéticas (18). Además, ratones con una delección específica del receptor de GIP en el tejido

adiposo son resistentes al desarrollo de obesidad inducida por la dieta y exhiben una significativa reducción en los niveles circulantes de triglicéridos (19).

La mayor parte de las acciones de GIP han sido puestas de relevancia mediante estudios farmacológicos, a través de la administración exógena de agonistas de GIP. Sin embargo, la importancia de la acción endógena de GIP en el control de la homeostasis de la glucosa no está del todo definida. Por tanto, el presente trabajo se llevó a cabo para dilucidar la posible implicación de GIP en el desarrollo de patologías asociadas al síndrome metabólico durante la edad adulta tras la rehabilitación nutricional. Dado que los efectos de la programación nutricional precoz pueden permanecer latentes, se utilizó un modelo animal de rata Wistar en el que los animales previamente sometidos a restricción nutricional fueron posteriormente realimentados con dieta grasa tras el destete. Asimismo, se estableció un análisis comparativo previo en función del sexo sobre el impacto de la rehabilitación nutricional con dieta grasa en la homeostasis glucídica.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales de experimentación

Para la realización de este estudio se utilizaron ratas Wistar que se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de manera automática (temperatura 25 ± 2 °C, humedad 50-70% y ciclos de luz-oscuridad de 12 h) y tuvieron libre acceso al agua de bebida. La reproducción de las ratas fue controlada para conocer con exactitud la fecha de inicio de la gestación y el día del nacimiento se procedió a uniformar las camadas en grupos de 8 neonatos. El final de la lactancia se marcó en el día 23 de vida y, tras el destete, las ratas fueron dispuestas en grupos de 3-4 animales por jaula. La alimentación de las ratas se llevó a cabo con dos tipos de dietas comerciales en forma de granulado prensado: dieta estándar (2.9 kcal/g; A04, Safe Diets) y dieta grasa (4.1 kcal/g; D12451, Research Diets) (Tabla 1). El alimento fue distribuido ad libitum o racionado en función de la población experimental. Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación y las muestras de sangre troncular se recogieron siempre a la misma hora del día (10:00 a. m.) en condiciones de ayuno (16 h). Para la obtención de suero sanguíneo se utilizaron tubos sin adición de anticoagulantes, mientras que para la obtención de plasma se adicionó EDTA (2 mg/ml) a los tubos de recolección. La sangre fue centrifugada (6500 rpm, 20 min, 4 °C) y, tanto el suero como el plasma se conservaron (-20 °C) hasta el momento de su utilización. Las muestras tisulares se fueron conservadas a -80 °C hasta su posterior utilización.

Todos los estudios realizados en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo a los principios y procedimientos descritos en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (20) y fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

Tabla 1. Tabla comparativa de la composición nutricional de las dietas

	Dieta estándar	Dieta grasa
Ingredientes (g/100g)		
Proteínas	16.3	20.3
Lípidos	2.9	20.3
Glúcidos	48.2	39.6
Almidón	45	7.3
Sacarosa	3.2	10.0
Maltodextrina	-	17.3
Celulosa	4.5	5.0
Mezcla vitamínica y mineral	4.6	5.7
Aporte calórico (% kcal/g)		
Proteínas	23	20
Lípidos	9	45
Carbohidratos	68	35

2.2. Modelo de restricción nutricional-realimentación

El modelo de intervención nutricional implantado en este trabajo está basado en un modelo de subnutrición perinatal previo (21), en el cual la restricción nutricional proteico-calórica crónica del 65% se prolonga desde la tercera semana de gestación hasta la edad adulta. A partir de este modelo de restricción nutricional crónica se aplicó un régimen de realimentación con dieta grasa tras el destete. Para ello, tanto la población control (C) como la

subnutrida (S) fueron subdivididas de manera aleatoria tras el destete, dando lugar a dos nuevas poblaciones de ratas adultas: control-realimentada (CR) y subnutrida-realimentada (SR), las cuales recibieron una dieta grasa ad libitum durante 22 semanas (Figura 1). Los parámetros nutricionales y metabólicos de los animales fueron determinados regularmente, y la evolución del peso corporal y de la ingesta calórica fue monitorizada diariamente.

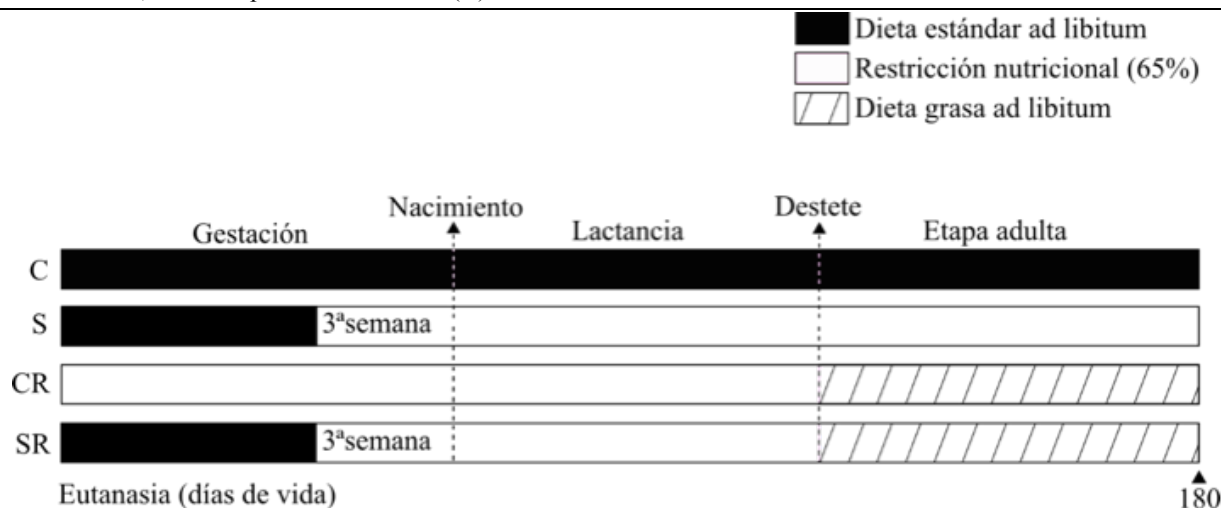


Figura 1. Vista esquematizada del modelo de restricción nutricional-realimentación. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

2.3. Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas

Las muestras hepáticas fueron fijadas en solución de Bouin [solución acuosa saturada de ácido pícrico (75% v/v), formaldehído 37% (20% v/v) y ácido acético glacial (5% v/v)], mientras que las muestras intestinales y de

tejido adiposo fueron fijadas en paraformaldehído (4% p/v). Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en alcoholes de graduación creciente y xileno e incluidas en bloques de parafina (Paraplast Plus, Tyco Healthcare, Mansfield, EEUU). Los bloques de parafina fueron cortados con microtomo (RM2125RT, Leica, Wetzlar,

Alemania) en secciones de 5 µm, las cuales fueron fijadas sobre portaobjetos con calor (37° C). Los cortes fueron posteriormente desparafinados en xileno y rehidratados con alcoholes de graduación decreciente y agua destilada para llevar a cabo los marcajes histoquímicos e inmunohistoquímicos correspondientes.

El tamaño de los adipocitos y la presencia de lípidos en muestras hepáticas de manera indirecta, se determinó mediante una tinción de hematoxilina/eosina. Para ello, los cortes histológicos fueron incubados con hematoxilina de Harris (Accustain Harris Hematoxylin, Sigma-Aldrich) y eosina (Eosina Amarillenta 1% DC, Panreac, Castellar del Vallés, España) durante un tiempo variable (1-2 min) y, finalmente, lavados con etanol 70° y agua destilada.

La detección inmunohistoquímica de GIP se llevó a cabo en muestras tisulares de duodeno, donde la presencia de células K, productoras y secretoras de GIP, es más abundante y homogénea. Para ello, se utilizó una técnica combinada de biotina-avidina (Vectastain Elite ABC kit, Vector). Los cortes histológicos fueron incubados con anticuerpos primarios frente GIP (24 h, 4 °C) y, tras varios lavados con TBS, se incubaron con anticuerpos secundarios especie-específicos acoplados a biotina (1 h, temperatura ambiente). Finalmente, las muestras se pusieron en contacto con una solución de avidina acoplada a peroxidasa (30 min, temperatura ambiente). El número de células positivas para GIP fue analizado mediante recuento directo y los resultados se expresaron como número de células por unidad de área de epitelio. Las micrografías fueron realizadas con un microscopio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan) acoplado a una cámara digital (XCD-U100CR, Sony, Tokyo, Japan) y fueron analizadas con el software informático Histolab (Microvision Instruments, Evry, Francia).

2.4. Test de tolerancia oral a la glucosa

Los test de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) se llevaron a cabo tras la finalización de las 22 semanas de dieta. Para ello, tras 16 horas de ayuno, las ratas recibieron una dosis oral de glucosa (40% p/v, 2 g/kg) y se recogieron muestras plasmáticas de la cola de los animales a diferentes tiempos (0, 10, 30, 60, 90 y 120 min). Con el fin de evitar la degradación de GIP, las muestras se recogieron en tubos con un inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa-IV (10 µl/ml; DPP-IV inhibitor, Millipore). La determinación de la concentración de insulina y GIP total se llevó a cabo mediante multiplex y la glucemia fue determinada en los tiempos anteriormente descritos con un glucómetro (OneTouch Ultra 2, LifeScan, Milpitas, EEUU). El área bajo la curva (AUC) de glucosa fue calculada aplicando la regla trapezoidal sobre los niveles de glucemia durante 120 minutos tras la sobrecarga oral de glucosa. El índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) fue calculado con la siguiente fórmula: $HOMA-IR =$

$\text{glucosa plasmática (mmol/l)} \times \text{insulina plasmática (}\mu\text{U/ml)}/22.5.$

2.5. Antagonismo farmacológico de GIP in vivo

Con el objetivo de determinar el papel de GIP en el desarrollo de un fenotipo obeso-diabético en las hembras de la población subnutrida y posteriormente realimentada con dieta grasa (SR), las ratas fueron inyectadas i.p. (25 nmol/kg) con un antagonista de GIP (Pro3(GIP), Europe GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante los últimos 21 días en dieta. Para llevar a cabo este estudio, un grupo de hembras SR fue inyectado diariamente (17:00 p. m.) con Pro3(GIP), mientras que a otro grupo se le administró un vehículo salino (NaCl 0.9% p/v). La dosis administrada fue seleccionada en función de estudios previos (22,23).

2.6. Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como la media aritmética de los datos y su error estándar. La significación estadística fue analizada mediante la prueba t de Student, para comparaciones de dos grupos, y mediante la prueba ANOVA, para comparaciones de más de dos grupos. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados para determinar interrelaciones entre variables. La significación fue considerada siempre que $P < 0.05$. Los resultados fueron analizados con el software GraphPad Prism 6 (San Diego, EEUU).

3. RESULTADOS

3.1. Las ratas SR experimentaron hiperfagia, incremento de la adiposidad e hipertrigliceridemia

Tras el destete, independientemente del sexo o del estatus nutricional previo, todas las ratas ganaron peso cuando fueron alimentadas con dieta grasa. Sin embargo, tras 22 semanas en dieta, el peso de las ratas SR no fue superior al mostrado por la población CR (Figura 2a,d).

Tanto los machos como las hembras S mostraron un menor peso corporal respecto a la población C durante todo el desarrollo de los experimentos (Figura 2a,d), así como de la ingesta alimentaria (Figura 2b,e) y calórica (Figura 2c,f). Aunque la cantidad de alimento ingerido por las ratas SR fue significativamente menor, en comparación con la población CR (Figura 2b,e), éstas fueron significativamente hiperfágicas cuando la cantidad de alimento ingerido se corrigió por el peso corporal (Figura 2c,f).

La proporción de grasa visceral mostrada por las ratas S fue significativamente inferior al de las ratas C (Tabla 2) y, de manera más acusada, en las hembras que en los machos (hembras: 4.7 vs machos: 2.2 veces). Sin embargo, tras la alimentación con dieta grasa, los depósitos de grasa visceral mostraron un aumento significativo en las ratas CR y SR, independientemente del sexo (Tabla 2).

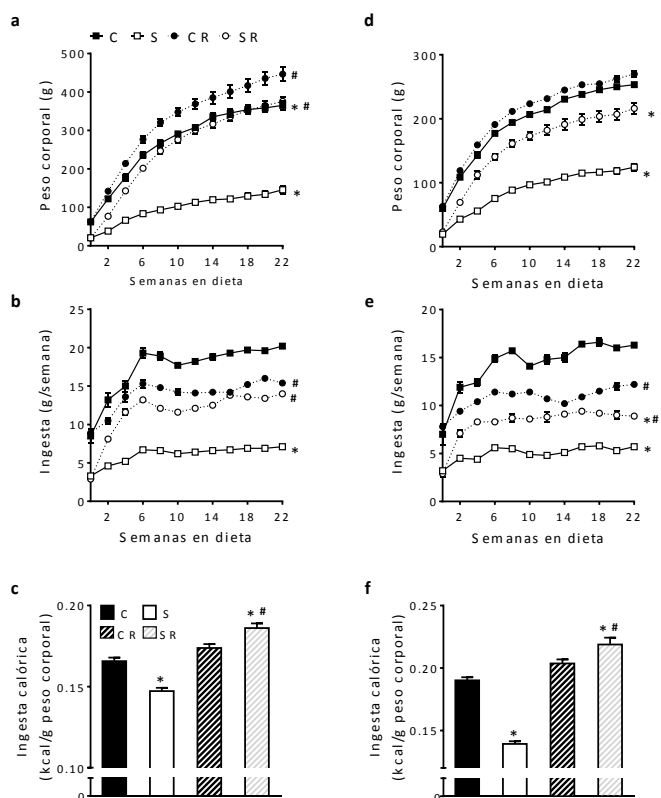


Figura 2. Las ratas subnutridas mostraron hiperfagia tras la realimentación con dieta grasa. Peso corporal, ingesta alimentaria e ingesta calórica en machos (a-c) y hembras (d-f) tras 22 semanas en dieta grasa. Los datos representan la media ± ESM (n=10-12). *P<0.05 S vs C, SR vs CR. #P<0.05 CR vs C, SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

Tabla 2. Características generales de las ratas tras la rehabilitación nutricional con dieta grasa. Parámetros fisiológicos y hormonales de las ratas, machos y hembras, de 180 días de vida (22 semanas en dieta grasa). Los datos representan la media ± ESM (n = 10-12). *P<0.05 S vs C, SR vs CR; #P<0.05 CR vs C, SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

	C	S	CR	SR
Machos				
Peso corporal (g)	365.0 ± 11.7	145.4 ± 13.2 ^a	466.7 ± 10.9 ^b	369.0 ± 13.7 ^{cd}
Grasa visceral (% p.c.)	2.90 ± 0.16	1.34 ± 0.14 ^a	5.56 ± 0.11 ^b	4.27 ± 0.26 ^{cd}
Peso de hígado (% p.c.)	2.20 ± 0.07	3.34 ± 0.25 ^a	2.26 ± 0.06	1.99 ± 0.05 ^c
Peso de páncreas (% p.c.)	0.24 ± 0.01	0.47 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.03 ^c
Glucosa (mmol/l)	4.33 ± 0.09	3.70 ± 0.41	4.49 ± 0.34	4.58 ± 0.25
Colesterol (mmol/l)	1.32 ± 0.11	1.33 ± 0.05	1.75 ± 0.09 ^b	1.43 ± 0.10
Triglicéridos (mmol/l)	0.41 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.56 ± 0.02 ^{cd}
Hembras				
Peso corporal (g)	248.6 ± 3.73	133.0 ± 3.10 ^a	265.2 ± 0.20 ^b	203.6 ± 4.80 ^{cd}
Grasa visceral (% p.c.)	2.78 ± 0.30	0.59 ± 0.05 ^a	3.54 ± 0.39 ^b	3.37 ± 0.25 ^c
Peso de hígado (% p.c.)	2.66 ± 0.09	3.21 ± 0.16 ^a	2.37 ± 0.04	2.45 ± 0.02 ^c
Peso de páncreas (% p.c.)	0.31 ± 0.02	0.43 ± 0.03 ^a	0.27 ± 0.01	0.31 ± 0.02 ^c
Glucosa (mmol/l)	4.46 ± 0.20	5.01 ± 0.12	5.37 ± 0.32 ^b	4.73 ± 0.14
Colesterol (mmol/l)	1.20 ± 0.14	1.36 ± 0.11	1.36 ± 0.16	1.75 ± 0.13
Triglicéridos (mmol/l)	0.45 ± 0.05	0.44 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.83 ± 0.09 ^{cd}

3.2. Los machos SR mostraron un ligero deterioro en la tolerancia a la glucosa y una disminución de la secreción postprandial de insulina

Durante el OGTT, los niveles plasmáticos de glucosa fueron significativamente inferiores en los machos S, respecto a la población C (Figura 3a). Asimismo, los niveles circulantes de insulina mostraron una significativa disminución en dicha población (Figura 3b), tanto en condiciones basales como transcurridos 15 minutos tras la sobrecarga oral de glucosa. A pesar de que tanto los machos CR como los SR mostraron un ligero deterioro de la tolerancia a la glucosa, la respuesta insulino secretora de la población SR fue significativamente menor a la observada en los machos CR (Figura 3b). De acuerdo con estos resultados, los niveles de HOMA-IR fueron significativamente más elevados en la población CR, respecto a los machos SR (Figura 3c), lo que sugería que estos últimos habrían retenido una mayor sensibilidad a la insulina respecto a la población CR.

3.3. Las hembras SR mostraron una severa intolerancia a

la glucosa y un elevado índice de resistencia a insulina

Al igual que se observó en los machos, las hembras S mostraron una menor secreción de insulina en comparación a la población C (Figura 4b). Sin embargo, tras la realimentación con dieta grasa, el deterioro observado en la tolerancia a la glucosa de las hembras SR (Figura 4a) fue significativamente más pronunciado que el exhibido por los machos SR, como muestran los valores de AUC de ambas poblaciones.

Dicho deterioro en la tolerancia a la glucosa se produjo a pesar de la hipersecreción de insulina mostrada por las hembras SR, en comparación a las hembras CR (Figura 4b). Como cabría esperar, las hembras S presentaron valores de HOMA-IR significativamente inferiores a los mostrados por la población C (Figura 4c). Por otro lado, los valores de HOMA-IR fueron significativamente superiores en la población SR, respecto a la CR (Figura 4c). Asimismo, las hembras SR mostraron los valores de HOMA-IR más elevados entre todas las poblaciones estudiadas, tanto machos como hembras.

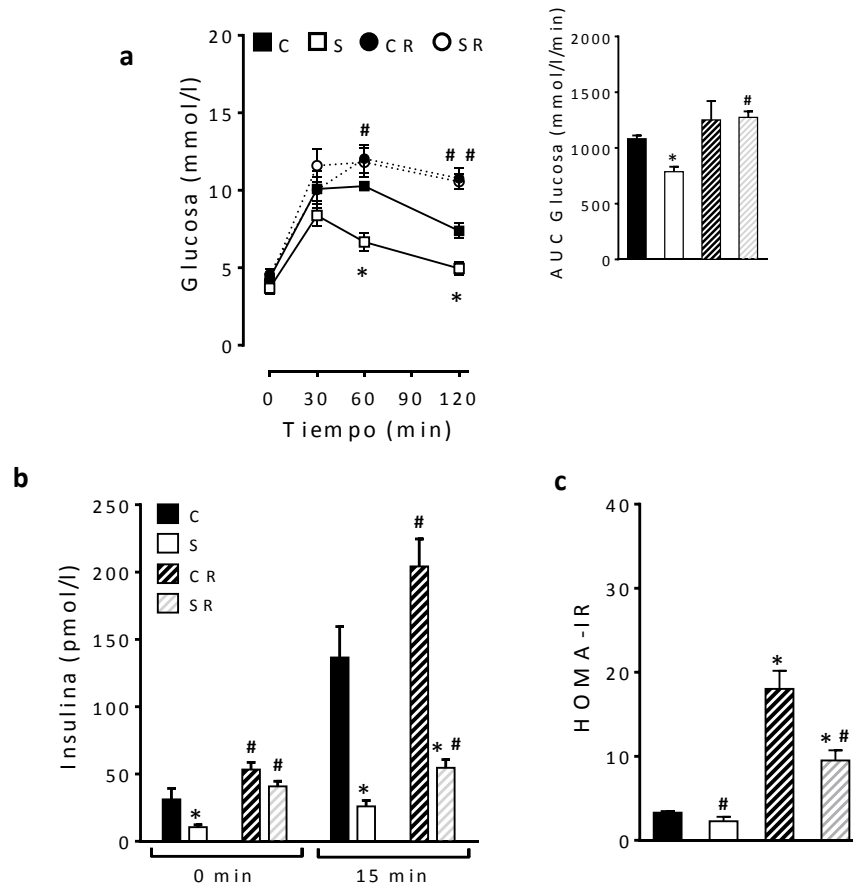


Figura 3. La realimentación con dieta grasa indujo un deterioro de la tolerancia a la glucosa en machos. (a) Niveles circulantes de glucosa, AUC de glucosa y (b) niveles circulantes de insulina durante el OGTT en machos tras 22 semanas en dieta. (c) Índice de resistencia a insulina (HOMA-IR). Los datos representan la media ± ESM (n=6). *P<0.05 S vs C, SR vs CR. #P<0.05 CR vs C, SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

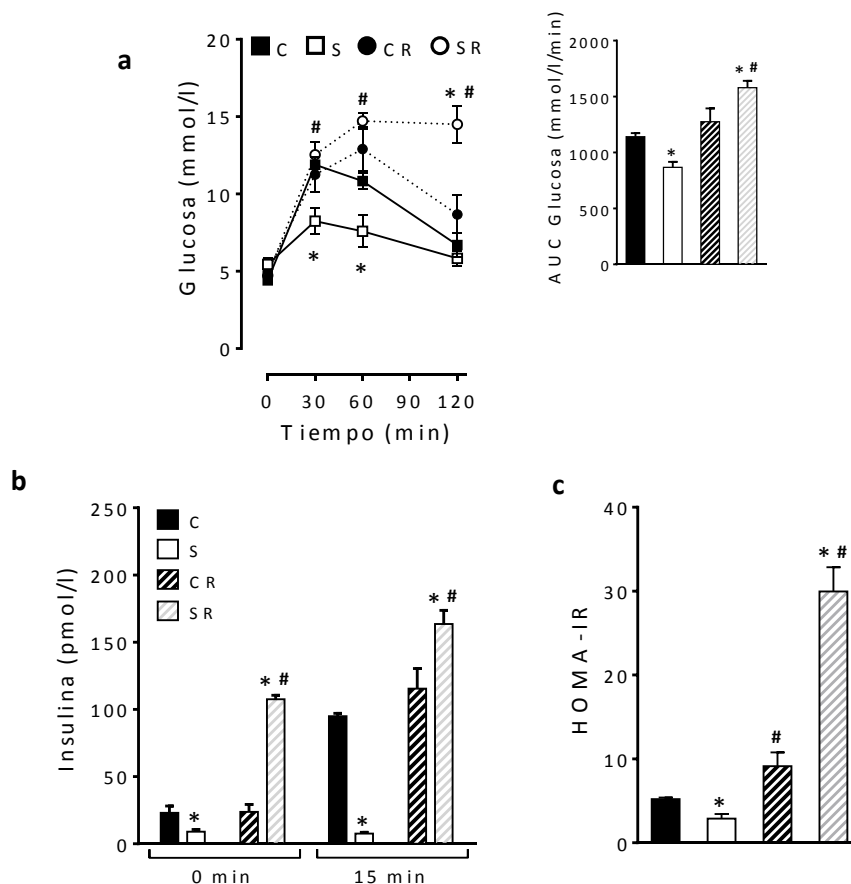


Figura 4. Las hembras SR mostraron intolerancia a la glucosa y una elevada resistencia a la insulina. (a) Niveles circulantes de glucosa, AUC de glucosa y (b) niveles circulantes de insulina durante el OGTT en hembras tras 22 semanas en dieta grasa. (c) Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR). Los datos representan la media \pm ESM (n=6). *P<0.05 S vs C, SR vs CR. #P<0.05 CR vs C, SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

En vista de que los resultados obtenidos tras los OGTT revelaron que los efectos adversos de la rehabilitación nutricional con dieta grasa sobre la homeostasis glucídica, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, tenían lugar principalmente en las hembras, los experimentos encaminados a determinar el papel de GIP en el desarrollo de dichas alteraciones se llevaron a cabo exclusivamente en dicha población.

3.4. La realimentación con dieta grasa indujo un incremento del contenido intestinal y de los niveles circulantes de GIP en las hembras SR

En primer lugar, los resultados de la cuantificación de células K, productoras de GIP, en muestras tisulares de duodeno en hembras, no mostraron diferencias significativas entre ninguna de las poblaciones estudiadas (Figura 5a). Sin embargo, se observó un incremento significativo del contenido intestinal de GIP en las

hembras CR y SR, respecto a sus respectivas poblaciones control (Figura 5b).

El análisis de los niveles circulantes de GIP mostró que, tanto en condiciones basales como tras la sobrecarga oral de glucosa, las ratas S mostraron niveles significativamente disminuidos de GIP respecto a la población C (Figura 5c). Por otro lado, mientras que las hembras CR no mostraron alteraciones significativas en comparación con la población C, los niveles plasmáticos de GIP exhibidos por las hembras SR fueron significativamente superiores a los mostrados por las hembras S, e incluso a los exhibidos por las hembras CR, tanto en condiciones basales como tras la sobrecarga oral de glucosa (Figura 5c).

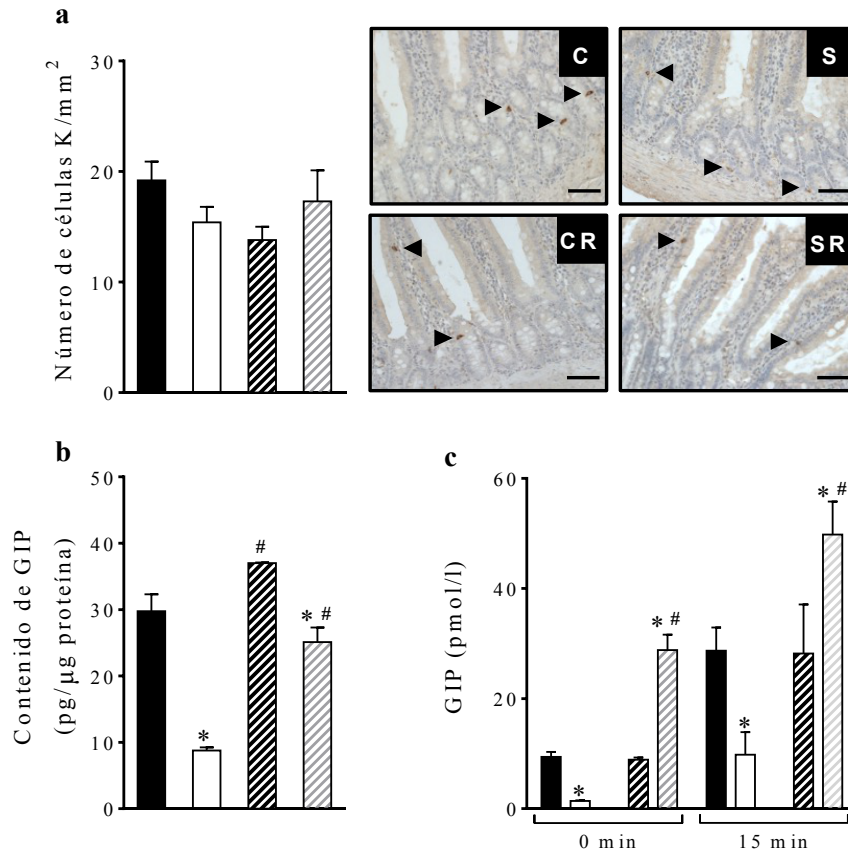


Figura 5. La alimentación con dieta grasa indujo un aumento en el contenido intestinal y en los niveles circulantes de GIP en las hembras SR. (a) Número de células K e imágenes representativas de la inmunolocalización de dichas células. (b) Contenido intestinal de GIP (n=4). (c) Niveles circulantes de GIP durante el OGTT (n=6). Los datos representan la media ± ESM. *P<0.05 S vs C y SR vs CR. #P<0.05 CR vs C y SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

3.5. Las hembras SR experimentaron hipertrofia adipocitaria, un elevado índice de resistencia a insulina y una limitada acumulación ectópica de lípidos

Entre otras acciones, GIP es capaz de actuar sobre el tejido adiposo promoviendo la acumulación de grasa en los adipocitos. Por lo tanto, en vista de los elevados niveles de GIP observados en las hembras SR (Figura 5c) y del significativo aumento de los depósitos de grasa en dicha población (Tabla 2), se analizó la morfología del tejido adiposo visceral y su relación con los niveles circulantes de GIP.

En primer lugar, ambas poblaciones de hembras alimentadas con dieta grasa exhibieron adipocitos de un tamaño significativamente superior al mostrado por sus respectivas poblaciones control (Figura 6a). No obstante, la hipertrofia experimentada por la población SR fue significativamente superior a la mostrada por la población CR (P<0.05; SR: 328% vs CR: 69%). Estas alteraciones se reflejaron en un marcado incremento de los niveles de HOMA-IR en las poblaciones alimentadas con dieta grasa, significativamente más elevados en la población SR,

respecto a la población CR (Figura 6b). Los análisis de correlación de Pearson mostraron una correlación positiva y significativa entre el tamaño de los adipocitos y los niveles de HOMA-IR ($r^2=0.88$, P<0.001). Asimismo, los niveles basales de GIP mostraron una correlación positiva y significativa con el tamaño de los adipocitos ($r^2=0.73$, P<0.001) y con los niveles de HOMA-IR ($r^2=0.81$, P<0.001) (Figura 6c).

Por el contrario, el análisis del contenido hepático de lípidos mostró que la acumulación de triglicéridos en el hígado fue significativamente superior en la población CR, respecto a las hembras SR (Figura 7a), mientras que el contenido de colesterol total fue similar en ambas poblaciones (Figura 7b). Asimismo, la observación microscópica del tejido hepático mostró un mayor número de inclusiones lipídicas en el hígado de la población CR (Figura 7c), evidenciando un mayor acúmulo ectópico de lípidos, respecto a la población SR. Por otro lado, tanto el contenido de triglicéridos como de colesterol hepático en las hembras S fue significativamente inferior al mostrado por la población C (Figura 7a,b).

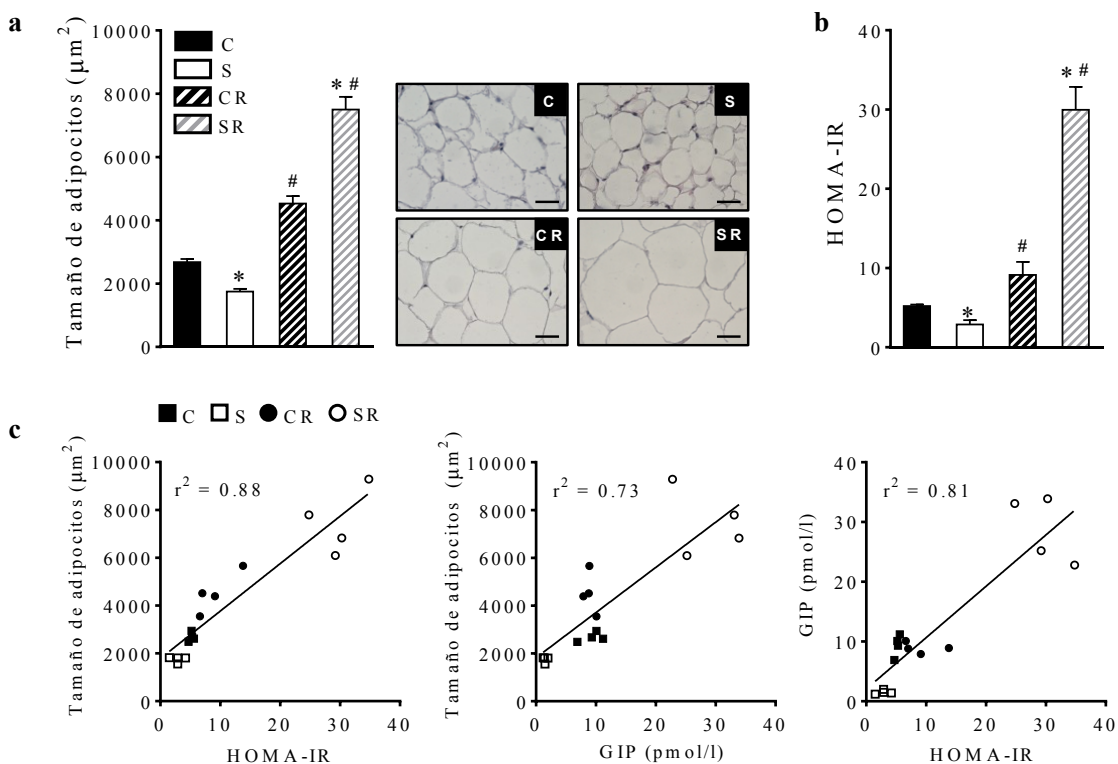


Figura 6. Las hembras SR mostraron hipertrofia adipocitaria y elevados valores de HOMA-IR. (a) Tamaño medio de los adipocitos del tejido adiposo periovárico. Imágenes representativas del marcaje de hematoxilina/eosina en adipocitos (Escala: 50µm) (n=4). (b) Índice de resistencia a insulina (HOMA-IR) (n=10-12). (c) Correlaciones de Pearson calculadas entre los niveles basales de GIP, HOMA-IR y el tamaño de los adipocitos entre las diferentes poblaciones. Los datos representan la media ± ESM. *P<0.05 S vs C y SR vs CR. #P<0.05 CR vs C y SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

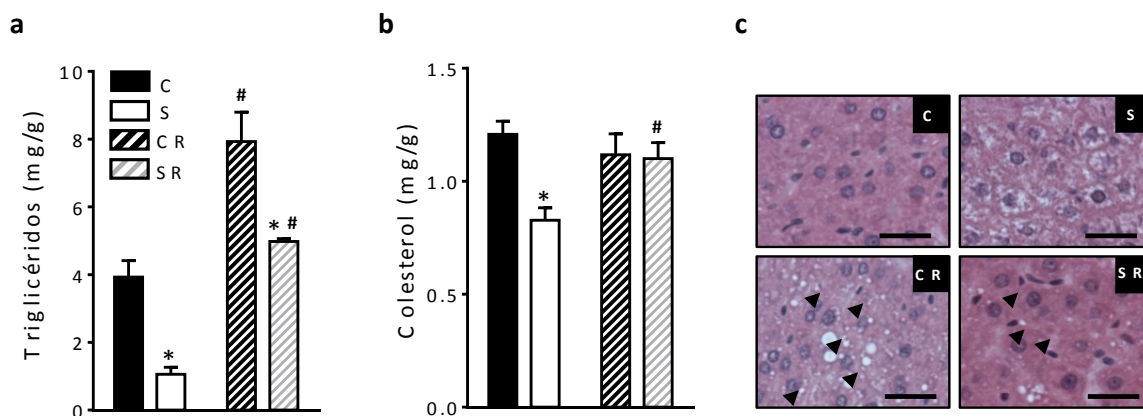


Figura 7. La población SR mostró un menor acúmulo hepático de lípidos que la población CR. (a) Contenido hepático de triglicéridos y (b) colesterol en hembras tras 22 semanas en dieta (n=4). (c) Imágenes representativas de la tinción de hematoxilina, se indica con flechas la presencia de gotas lipídicas (Escala: 10µm). Los datos representan la media ± ESM. *P<0.05 S vs C y SR vs CR. #P<0.05 CR vs C y SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

3.6. El tratamiento con (Pro3)GIP revirtió parcialmente la intolerancia a la glucosa mostrada por las hembras SR

Los resultados obtenidos sugerían que un aumento crónico de los niveles endógenos de GIP estaba contribuyendo al desarrollo de las alteraciones metabólicas observadas en las hembras SR. Para testar dicha hipótesis, se bloqueó la acción de GIP en las hembras SR durante los últimos 21 días de dieta con un antagonista del receptor de

GIP, (Pro3)GIP. Como población control se utilizó un grupo de ratas SR tratadas con suero salino durante el mismo periodo. La administración diaria de (Pro3)GIP durante 21 días no tuvo repercusiones sobre el peso corporal ni sobre la ingesta alimentaria SR (Figura 8a,b). Por el contrario, los animales tratados con (Pro3)GIP mostraron una mejora sustancial en la homeostasis glucídica. Concretamente, se observó una significativa disminución de los niveles plasmáticos de glucosa a los 30

y 60 minutos, así como del AUC de glucosa durante el OGTT (Figura 8c), respecto a las hembras SR no tratadas. Asimismo, se observó una significativa disminución de la secreción de insulina en respuesta a la sobrecarga oral de glucosa en la población tratada con (Pro3)GIP (Figura 8d). Sin embargo, los niveles de insulina continuaron siendo

considerablemente mayores que los observados anteriormente en las ratas alimentadas con dieta estándar. Los niveles de HOMA-IR también experimentaron un acusado descenso tras la administración de (Pro3)GIP, respecto a la población de ratas no tratadas (Figura 8e).

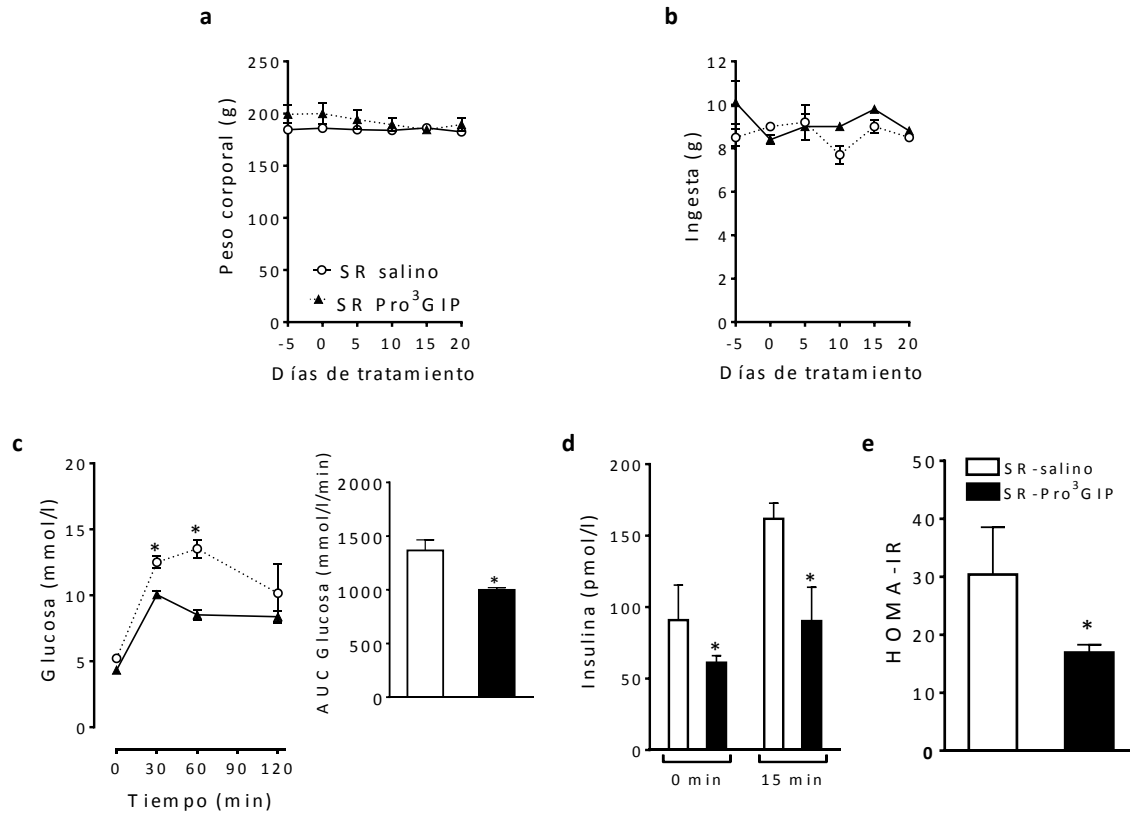


Figura 8. La administración diaria de (Pro³)GIP revirtió el estado de intolerancia a la glucosa de las hembras SR. (a) Evolución del peso corporal y (b) la ingesta en hembras SR tras 21 días de tratamiento con (Pro³)GIP (25nmol/kg/día). (c) Niveles circulantes de glucosa, AUC de glucosa y (d) niveles circulantes de insulina durante el OGTT. (e) Índice de resistencia a insulina (HOMA-IR). Los datos representan la media ± ESM (n=4). *P<0.05 SR-Pro³GIP vs SR-salino. SR-salino: subnutrida-realimentada tratada con suero salino, SR-Pro³GIP: subnutrida-realimentada tratada con Pro³GIP.

3.7. Las ratas tratadas con (Pro3)GIP mostraron una disminución del tamaño de los adipocitos y un aumento de los triglicéridos hepáticos

El contenido relativo de grasa visceral disminuyó drásticamente tras el tratamiento con (Pro3)GIP, respecto a las hembras SR no tratadas (Figura 9a). Asimismo, el tratamiento con (Pro3)GIP redujo significativamente el tamaño de los adipocitos (>50%), respecto a la población no tratada (Figura 9b,c). Por otra parte, el bloqueo de la

acción de GIP dio lugar a un significativo incremento en el acúmulo hepático de triglicéridos (Figura 9d) y no se observaron cambios respecto al contenido de colesterol (Figura 9e). Las ratas tratadas con (Pro3)GIP también mostraron una disminución de la trigliceridemia (SR-Pro3GIP: 0.69±0.10 vs. SR-salino: 0.91±0.07 mmol/l), mientras que los niveles circulantes de colesterol no parecieron verse afectados (SR-Pro3GIP: 2.11±0.12 vs. SR-salino: 1.87±0.04 mmol/l).

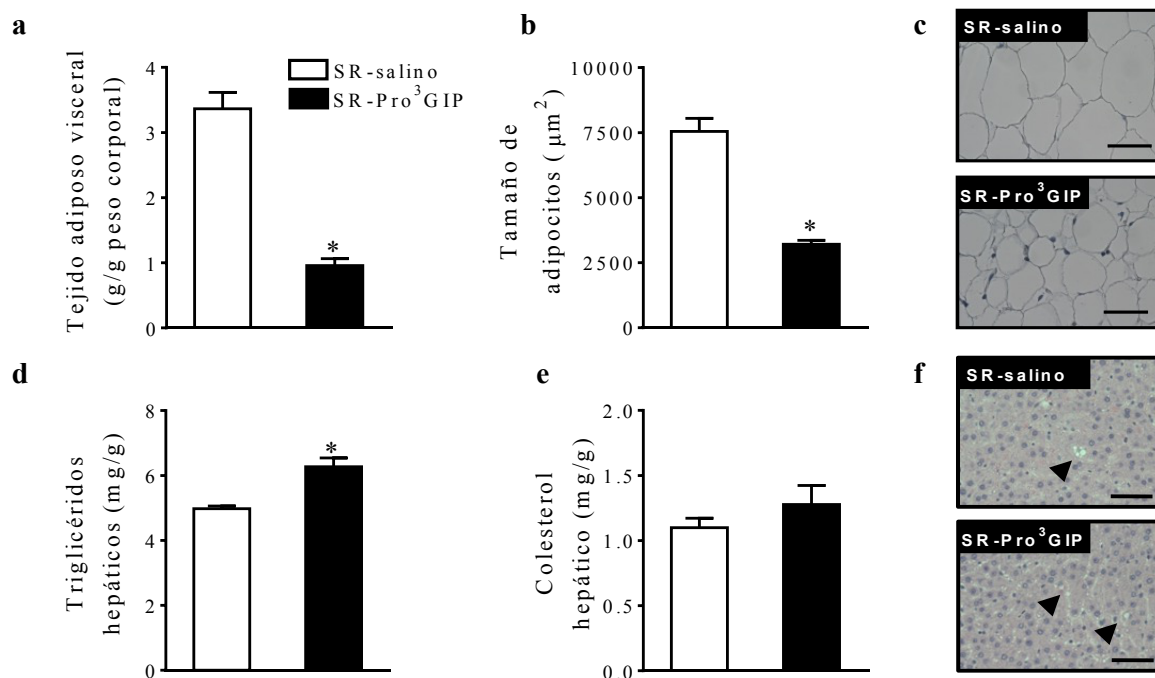


Figura 9. Efecto del tratamiento con (Pro³)GIP sobre el tamaño adipocitario y el contenido hepático de lípidos. (a) Peso del tejido adiposo visceral, expresado como la suma de los depósitos de grasa periovárica y retroperitoneal, relativa al peso corporal. (b) Tamaño medio de los adipocitos del tejido adiposo periovárico y (c) micrografías representativas del tamaño adipocitario. (d) Contenido hepático de triglicéridos y (e) colesterol. (f) Micrografías representativas de la acumulación de gotas lipídicas (flechas) en el hígado (tinción de hematoxilina/eosina). La barra de escala representa 50µm. Los datos representan la media ± ESM. (n=4). *P<0.05 SR-Pro³GIP vs SR-salino. SR-salino: subnutrida-realimentada tratada con suero salino, SR-Pro³GIP: subnutrida-realimentada tratada con Pro³GIP.

4. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que un aporte deficiente de nutrientes durante la etapa perinatal induce una respuesta adaptativa que desemboca en la aparición de alteraciones metabólicas cuando el organismo es enfrentado a un incremento del aporte calórico. Asimismo, resaltan la diferente adaptación de la homeostasis glucídica tras la rehabilitación nutricional en función del sexo. Concretamente, las hembras previamente sometidas a restricción nutricional y posteriormente alimentadas con dieta grasa desarrollaron un fenotipo de síndrome metabólico, caracterizado por un incremento de la adiposidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, de manera significativamente más acusada que los machos.

Previamente, se ha descrito que la subnutrición crónica induce hipersensibilidad periférica a la insulina durante la lactancia (24) y en ratas adultas jóvenes (21). En este trabajo se muestra que la mejora de la tolerancia a la glucosa se preserva durante toda la vida de los animales, siempre y cuando se mantengan las condiciones de restricción nutricional. Por el contrario, la rehabilitación nutricional con dieta grasa indujo consecuencias perjudiciales en la homeostasis de la glucosa. Dichas consecuencias evidenciaron una respuesta adaptativa al cambio de dieta en función del sexo, siendo las hembras más propensas a desarrollar alteraciones más severas de la

homeostasis glucídica. En este sentido, estudios previos han mostrado que las alteraciones metabólicas ocurridas durante los procesos de rehabilitación nutricional afectan predominantemente a las hembras (25,26). Asimismo, se ha descrito que los machos sometidos a restricción nutricional estarían protegidos frente a la obesidad y al desarrollo de resistencia a la insulina en la edad adulta, hecho que ha sido asociado a un aumento del catabolismo basal y del gasto energético (27). No obstante, también se ha observado que los machos exhiben una mayor vulnerabilidad al desarrollo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa cuando son enfrentados a una sobrecarga energética (28,29). Las razones para estas discrepancias pueden residir no sólo en el tipo de restricción nutricional, sino en el momento de su aplicación y en la composición dietética de la rehabilitación nutricional. No obstante, mientras que en las publicaciones citadas anteriormente se utilizaron dietas estándar para llevar a cabo los estudios de rehabilitación nutricional, en este trabajo se utilizó una dieta alta en grasa para favorecer la aparición del fenotipo de síndrome metabólico, poniendo de manifiesto la relevancia del tipo de dieta suministrado y la singularidad del presente estudio.

Tras un periodo de restricción nutricional, la elevada tasa de crecimiento durante la fase de rehabilitación nutricional da lugar a un rápido incremento de los depósitos de grasa, que predomina sobre la reconstitución

de la masa magra (30). Asimismo, los riesgos asociados a la obesidad están más estrechamente relacionados con elevados índices de grasa corporal que con que el peso corporal en sí mismo (31). En este trabajo, la hiperfagia exhibida por la población SR dio lugar a la aparición de un fenotipo claramente obesogénico, incluyendo elevados niveles de triglicéridos circulantes y un incremento de los depósitos de grasa visceral superior al resto de poblaciones. Estos resultados sugieren una estrecha relación entre las adaptaciones provocadas por la rehabilitación nutricional y el incremento en la capacidad de acúmulo de lípidos, lo que daría lugar a un empeoramiento de la homeostasis glucídica, particularmente agravado en el caso de las hembras.

En vista del dimorfismo sexual observado respecto a las alteraciones en la homeostasis glucídica y a que GIP ha sido extensamente descrito como un regulador crucial de la secreción de insulina en respuesta a la ingesta de alimentos (32,33), llevamos a cabo estudios encaminados a determinar su papel en la aparición de intolerancia a la glucosa en las hembras sometidas a realimentación con dieta grasa. En primer lugar, el hecho de que el contenido intestinal de GIP se encontrase incrementado tras la rehabilitación nutricional, a pesar de no observar alteraciones en el número de células K, sugiere una preservación de los mecanismos de producción endógena de GIP en respuesta a una administración prolongada de una dieta grasa. Por otro lado, se ha descrito que una alimentación con dieta grasa promueve una elevación de los niveles circulantes de GIP (16). Asimismo, una exagerada secreción de GIP ha sido recientemente descrita en pacientes diabéticos tipo 2 (34). Por tanto, en vista de los elevados niveles postprandiales de insulina mostrados por las hembras SR, es posible sugerir que GIP estaría jugando un papel predominante en la regulación entero-insular de la secreción de insulina durante la rehabilitación nutricional. Igualmente, el hecho de que únicamente las hembras SR muestren una exacerbada secreción de GIP en respuesta a una sobrecarga oral de glucosa revela, por primera vez, la posible existencia de una programación nutricional del eje entero-insular, como resultado de una restricción nutricional precoz y posterior realimentación.

Entre los efectos extrapancreáticos de GIP, destaca su capacidad para promover la diferenciación adipocitaria y la acumulación de lípidos en el tejido adiposo (8). De acuerdo al marcado incremento en los niveles circulantes de GIP mostrado por las hembras SR y a que el tamaño adipocitario es un marcador predictivo de resistencia a insulina (35), la correlación observada entre los niveles basales de GIP, el tamaño de los adipocitos y los niveles de HOMA-IR, refuerza el papel de GIP como mediador en el desarrollo de resistencia a la insulina en el tejido adiposo de estos animales. Asimismo, la drástica reducción de los depósitos de grasa visceral y del tamaño de los adipocitos observada tras el tratamiento con el antagonista farmacológico de GIP fue acompañada con un sustancial restablecimiento de la homeostasis glucídica en las hembras SR. Dado que el crecimiento acelerado tras la

rehabilitación nutricional ha sido ampliamente reconocido por maximizar los mecanismos de conservación de la energía (36), los resultados mostrados en el presente trabajo señalan a GIP como una hormona ahorrativa, que estaría desempeñando un papel esencial en la acumulación de lípidos en el tejido adiposo cuando las ratas sometidas a restricción nutricional precoz son enfrentadas a un aporte calórico excesivo.

Curiosamente, el deterioro de la tolerancia a la glucosa mostrado por las hembras SR fue acompañado de una menor acumulación hepática de lípidos. Previamente, se ha descrito que el incremento de los depósitos de grasa visceral podría estar involucrado en la prevención de la deposición ectópica de lípidos (37). Asimismo, estudios previos han mostrado que la incapacidad para almacenar lípidos en el hígado da lugar a una exacerbación de la hipertrigliceridemia y la hiperglucemia, agravando los estados de resistencia a insulina (38,39). Por tanto, estos estudios sugieren que una óptima redistribución ectópica de lípidos en forma de triglicéridos representa una respuesta alostática del organismo, previniendo su acumulación en otros órganos como el músculo o el páncreas (40).

En este sentido, la mejora de la homeostasis glucídica observada en las hembras SR tras el tratamiento con (Pro3)GIP tuvo lugar en paralelo a un aumento del contenido hepático de lípidos y a una disminución en los niveles circulantes de triglicéridos. Paradójicamente, estudios previos han mostrado que la inhibición farmacológica de GIP está asociada a una reducción del contenido hepático de lípidos (22,41). No obstante, también ha sido descrito que la nutrición perinatal puede programar tanto el almacenamiento como el metabolismo hepático de lípidos en el adulto (42,43). Por tanto, dichas discrepancias podrían residir, precisamente, en el fenotipo ahorrativo mostrado por las hembras SR, dando lugar a un aumento en la acumulación de lípidos a nivel hepático tras el bloqueo farmacológico de la acción de GIP.

A partir de los resultados obtenidos, sin embargo, no es posible establecer si las alteraciones observadas a nivel del eje entero-insular representan un defecto primario, o si se trata de un defecto asociado a otras alteraciones metabólicas. No obstante, individuos sanos alimentados con dieta grasa muestran elevados niveles circulantes de GIP antes del desarrollo de resistencia a la insulina, lo que sugiere que la hipersecreción de GIP precedería a la pérdida de la acción de esta hormona (44). Por tanto, el incremento en los niveles circulantes de GIP parece representar el estímulo necesario para la hipersecreción de insulina y la acumulación de lípidos en el tejido adiposo de estos animales, dando lugar al desarrollo de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina.

El papel de GIP en la aparición de resistencia a insulina ha sido previamente descrito mediante el uso de antagonistas (22) y en pacientes diabéticos tipo 2 sometidos a bypass gástrico (45). No obstante, los resultados mostrados en el presente trabajo indican, por primera vez, que la rehabilitación nutricional tras un

episodio de restricción nutricional precoz da lugar a la aparición de niveles exacerbados de GIP, ejerciendo un efecto perjudicial en la homeostasis glucídica. Por tanto, intervenciones terapéuticas encaminadas a disminuir la acción de GIP parecen representar un método eficaz en la prevención de las patologías asociadas al síndrome metabólico, como la obesidad o la diabetes tipo 2. No obstante, un control nutricional eficaz, orientado a disminuir la ingesta calórica, constituye un factor indispensable para evitar la aparición de dichas patologías.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que GIP juega un papel determinante en el incremento de la adiposidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, desarrolladas como consecuencia de una rehabilitación nutricional con dieta grasa tras un episodio de restricción nutricional precoz. Asimismo, la existencia de un dimorfismo sexual en la programación nutricional de dichas alteraciones subraya la relevancia de la nutrición materna en la posible transmisión intergeneracional de la predisposición al desarrollo del síndrome metabólico.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011/25420), la Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423) y el Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM, Instituto de Salud Carlos III).

7. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

8. REFERENCIAS

1. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;36:62-7.
2. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019-22.
3. Howie GJ, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br J Nutr* 2012;108:298-307.
4. Bieswal F, Ahn M-T, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, et al. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity* 2006;14:1330-43.
5. Chen LL, Hu X, Zheng J, Kong W, Zhang HH, Yang WH, et al. Lipid overaccumulation and drastic insulin resistance in adult catch-up growth rats induced by nutrition promotion after undernutrition. *Metabolism*

- 2011;60:569-78.
6. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept* 2003;114:189-96.
7. Krarup T, Holst JJ, Larsen KL. Responses and molecular heterogeneity of IR-GIP after intraduodenal glucose and fat. *Am J Physiol* 1985;249:E195-200.
8. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132:2131-57.
9. Mcintyre N, Holdsworth C., Turner D. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 1964;284:20-1.
10. Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab The Endocrine Society*; 1964;24:1076-82.
11. Ding W-G, Gromada J. Protein Kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta cells by glucose-dependent insulintropic polypeptide. *Diabetes* 1997;46:615-21.
12. Wang Y, Montrose-Rafizadeh C, Adams L, Raygada M, Nadiv O, Egan JM. GIP regulates glucose transporters, hexokinases, and glucose-induced insulin secretion in RIN 1046-38 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1996;116:81-7.
13. Kim SJ, Winter K, Nian C, Tsuneoka M, Koda Y, McIntosh CH. Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and downregul. *J Biol Chem* 2005;280:22297-307.
14. Bailey CJ, Flatt PR, Kwasowski P, Powell CJ, Marks V. Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets. *Acta Endocrinol* 1986;112:224-9.
15. Morgan LM, Tredger JA, Hampton SM, French AP, Peake JC, Marks V. The effect of dietary modification and hyperglycaemia on gastric emptying and gastric inhibitory polypeptide (GIP) secretion. *Br J Nutr* 1988;60:29-37.
16. Gniuli D, Calcagno A, Dalla Libera L, Calvani R, Leccesi L, Caristo ME, et al. High-fat feeding stimulates endocrine, glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)-expressing cell hyperplasia in the duodenum of Wistar rats. *Diabetologia* 2010;53:2233-40.
17. Zhou H, Yamada Y, Tsukiyama K, Miyawaki K, Hosokawa M, Nagashima K, et al. Gastric inhibitory polypeptide modulates adiposity and fat oxidation under diminished insulin action. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:937-42.
18. Kim S jin, Nian C, McIntosh CH. Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulintropic

- polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 2007;282:8557-67.
19. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 2002;8:738-42.
 20. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th edition. The National Academies Press. Washington DC, 2011.
 21. Escrivá F, Rodríguez C, Cacho J, Álvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM. Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol Metab* 1992;263:E1-7.
 22. McClean PL, Irwin N, Cassidy RS, Holst JJ, Gault VA, Flatt PR. GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:1746-55.
 23. Gault VA, Irwin N, Green BD, McCluskey JT, Greer B, Bailey CJ, et al. Chemical ablation of gastric inhibitory polypeptide receptor action by daily (Pro3) GIP administration improves glucose tolerance and ameliorates insulin resistance and abnormalities of islet structure in obesity-related diabetes. *Diabetes* 2005;54:2436-46.
 24. Lizárraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, de Toro-Martín J, Martínez-Hondurilla C, Escrivá F, Álvarez C. Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats. *Am J Physiol Metab* 2012;302:E1070-7.
 25. Van Straten EME, Bloks VW, van Dijk TH, Baller JFW, Huijkman NCA, Kuipers I, et al. Sex-dependent programming of glucose and fatty acid metabolism in mouse offspring by maternal protein restriction. *Gend Med Excerpta Medica, Inc.*; 2012;9:166-79.
 26. Hallam MC, Reimer RA. A maternal high-protein diet predisposes female offspring to increased fat mass in adulthood whereas a prebiotic fibre diet decreases fat mass in rats. *Br J Nutr* 2013;110:1732-41.
 27. Garg M, Thamocharan M, Dai Y, Thamocharan S, Shin BC, Stout D, et al. Early postnatal caloric restriction protects adult male intrauterine growth-restricted offspring from obesity. *Diabetes* 2012;61:1391-8.
 28. Zambrano E, Bautista CJ, Deás M, Martínez-Samayoá PM, González-Zamorano M, Ledesma H, et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 2006;571:221-30.
 29. Sugden MC, Holness MJ. Gender-specific programming of insulin secretion and action. *J Endocrinol* 2002;175:757-67.
 30. Dulloo A, Girardier L. Adaptive changes in energy expenditure during refeeding following low-calorie intake: evidence for a specific metabolic component favoring fat storage. *Am J Clin Nutr* 1990;52:415-20.
 31. Orozco-Sólis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav Elsevier Inc.*; 2009;96:481-92.
 32. Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, et al. Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. 2004;113:635-45.
 33. Lewis JT, Dayanandan B, Habener JF, Kieffer TJ, Medicine JTL. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist. *Endocrinology* 2000;141:3710-6.
 34. Alsema M, Rijkeljkhuizen JM, Holst JJ, Teerlink T, Scheffer PG, Eekhoff EMW, et al. Preserved GLP-1 and exaggerated GIP secretion in type 2 diabetes and relationships with triglycerides and ALT. *Eur J Endocrinol* 2013;169:421-30.
 35. Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renström F, Ruge T, Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and “hyperleptinaemia”. *Diabetologia* 2007;50:625-33.
 36. Dulloo AG. Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:155-71.
 37. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:338-49.
 38. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, et al. Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 2003;111:737-47.
 39. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor γ contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003;278:34268-76.
 40. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, et al. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* 2007;3:e64.
 41. Gault VA, McClean PL, Cassidy RS, Irwin N, Flatt PR. Chemical gastric inhibitory polypeptide receptor antagonism protects against obesity, insulin resistance, glucose intolerance and associated disturbances in mice fed high-fat and cafeteria diets. *Diabetologia* 2007;50:1752-62.

42. Xu X, Hu J, Mcgrath BC, Cavener DR. GCN2 in the brain programs PPAR γ 2 and triglyceride storage in the liver during perinatal development in response to maternal dietary fat. *PLoS One* 2013;8:e75917.
43. Burdge GC, Phillips ES, Dunn RL, Jackson AA, Lillycrop KA. Effect of reduced maternal protein consumption during pregnancy in the rat on plasma lipid concentrations and expression of peroxisomal proliferator-activated receptors in the liver and adipose tissue of the offspring. *Nutr Res* 2004;24:639-46.
44. Brøns C, Jensen CB, Storgaard H, Hiscock NJ, White A, Appel JS, et al. Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. *J Physiol* 2009;587:2387-97.
45. Lips MA, de Groot GH, van Klinken JB, Aarts E, Berends FJ, Janssen IM, et al. Calorie Restriction is a Major Determinant of the Short-Term Metabolic Effects of Gastric Bypass Surgery in Obese Type 2 Diabetic Patients. *Clin Endocrinol* 2014;80:834-42.