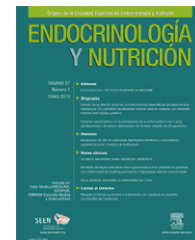




ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN

www.elsevier.es/endo



ORIGINAL

Dietas ricas en grasa y composición corporal a lo largo de dos generaciones. Estudio experimental

Cristina Suarez, Andrea Ferreira Monteiro, Elisa Macri, Ana Chiarenza, Susana Zeni, Patricia Rodríguez, Patricia Boyer y Silvia Friedman*

Cátedra de Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 29 de junio de 2011; aceptado el 9 de enero de 2012

Disponible en Internet el 8 de marzo de 2012

PALABRAS CLAVE

Composición corporal;
Dieta;
Rata

KEYWORDS

Body composition;
Diet;
Rat

Resumen

Antecedentes y objetivo: A pesar de los últimos avances acerca de los factores nutricionales que inducen modificaciones epigenéticas, la información en edades tempranas es escasa. El presente trabajo estudió en un modelo experimental a lo largo de dos generaciones las posibles modificaciones en la composición corporal, la posible expresión de cambios epigenéticos, y el resultado del consumo de dietas isocalóricas con niveles de grasa diferentes.

Materiales y métodos: Ratas Wistar hembras al destete se dividieron en dos grupos que recibieron una dieta con 7 y 15% de grasa (rica en grasa). A los 70 días se aparearon (M_1) y sus crías (C_1) constituyeron la primera generación; C_1 a los 70 días fueron apareadas (M_2) y sus crías (C_2) constituyeron la segunda generación. Al destete, se evaluaron tanto las madres como las crías (M_1 , M_2 y C_1 , C_2), el peso (P) y composición corporales % de grasa (% Gra), por método químico y contenido mineral óseo de esqueleto total (CMO) por densitometría, expresado como %CMO. **Resultados:** Al destete, en los grupos con dieta rica en grasa M_2 y C_2 (15% Gra) se observó un incremento significativo del P y % Gra ($p < 0,05$), mientras que el aumento en el % Gra ya se observó en C_1 y M_1 ($p < 0,001$). Por el contrario, el % CMO de M_2 y C_2 disminuyó significativamente ($p < 0,001$).

Conclusión: este estudio pone de manifiesto la potencial necesidad de modificar ciertos hábitos alimentarios que eviten repetir patrones distorsionados de generación en generación.

© 2011 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

High-fat diets and body composition over two generations. An experimental study

Abstract

Introduction and objective: Despite recent findings reported on the nutritional factors that induce epigenetic changes, little information is available at early ages. This study analyzed in an experimental model, over two generations, potential changes in body composition and

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: friedman@odon.uba.ar (S. Friedman).

potential expression of epigenetic changes as the result of the intake of isoenergetic diets with different fat levels.

Materials and methods: At weaning, Wistar female rats were divided into two groups that were fed either a control diet (fat = 7% w/w) or a high-fat diet (15% w/w). Rats were mated at 70 days (M_1) and their pups (P_1) were the first generation; P_1 rats were mated at 70 days (M_2) and their pups (P_2) represented the second generation. At weaning, mothers and pups (M_1 , M_2 and P_1 , P_2) were measured body weight (W) and composition (% body fat, %BF), and total skeleton bone mineral content (BMC), expressed as %BMC, using chemical and DXA methods respectively.

Results: At weaning, high-fat diet groups M_2 and P_2 showed significant increases in W and %BF ($p < 0.05$); increased %BF values were already found in the M_1 and P_1 groups ($p < 0.001$). By contrast, %BMC significantly decreased in M_2 and P_2 rats ($p < 0.001$).

Conclusion: This study demonstrates the need to review certain eating habits to avoid perpetuation of unhealthy patterns generation after generation.

© 2011 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Existen evidencias que sugieren que la elección de alimentos que la madre realiza durante el embarazo puede sentar las bases para la aceptación de los mismos en la vida posnatal. El líquido amniótico que rodea al feto, manteniendo la temperatura fetal, constituye una fuente rica de exposición sensorial para el feto. Muchos sabores presentes en la dieta materna lo están en el líquido amniótico^{1,2} y, dado que el gusto y el olfato ya son funcionales durante la vida fetal, constituyen las primeras experiencias de contacto que ocurren antes de nacer. La exposición a estos sabores «transmisibles» influiría en su aceptación posnatalmente^{3,4}; esta experiencia temprana, que puede proporcionar un «puente de sabor» y familiarizar al feto con sabores de la dieta materna, desempeña un papel clave en la adquisición de alimentos y preferencias^{4,5}.

Al nacer, los padres participan de las primeras experiencias de los niños con los alimentos; la leche materna, portadora de sabores facilita la transición a la dieta del adulto. Como jóvenes omnívoros, están dispuestos a aprender a ingerir la dieta de los adultos y, a pesar de la amplia gama de alimentos que se les ofrece, desarrollan tempranamente la capacidad para repetir el patrón alimentario familiar. Estas preferencias alimentarias adquiridas en la infancia reflejan los alimentos disponibles y accesibles, y lo preparan para constituirse en el modelo de patrón cultural de alimentación de su futura descendencia.

Existe evidencia de que la perturbación metabólica intrauterina puede influenciar la expresión génica y modular el fenotipo del organismo durante la vida adulta. La exposición durante la vida temprana a factores nutricionales inadecuados puede ser crítica en el crecimiento y desarrollo de los tejidos corporales, constituyendo un factor de riesgo potencial de enfermedades debido a patrones alimentarios inapropiados por defecto^{6,7} o por exceso⁸. A pesar de los últimos avances acerca de los factores nutricionales que inducen modificaciones epigenéticas, es escasa la información en edades tempranas⁹.

El presente trabajo estudió en un modelo experimental, a lo largo de dos generaciones, las posibles modificaciones

en la composición corporal, resultado del consumo de dietas isocalóricas con niveles de grasa diferentes.

Material y métodos

Población animal

Se estudiaron, desde el destete (22 ± 1 días de edad), 90 ratas hembra de la cepa Wistar con un peso promedio inicial de $44,7 \pm 0,7$ g (media \pm error estándar, EE), que provenían de la Cátedra de Bioquímica General y Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires. El protocolo presentado cumplía con las especificaciones establecidas internacionalmente para el uso y cuidado de los animales de laboratorio¹⁰.

Los animales se alojaron en jaulas galvanizadas, con piso de malla y suspendidas, con la finalidad de mantener las condiciones de higiene y evitar la coprofagia. La temperatura ambiente se mantuvo en $21 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante un sistema termostatzado y la humedad relativa fue de 50-60%. Además, cuenta con un sistema que permite mantener estrictamente los períodos de luz-oscuridad de 12 h/12 h, ya que modificaciones de los mismos pueden provocar cambios en la conducta del animal y alteraciones en el ritmo de la alimentación¹¹.

Al momento del destete, los animales se dividieron en tres grupos y se verificó que los pesos promedio iniciales no difirieran entre grupos ($p > 0,05$). Un grupo de 10 animales (C_0) fue sacrificado para la determinación de los valores basales. Dos grupos de 40 animales cada uno, recibieron a libre demanda durante todo el período experimental una de dos dietas: dieta control, cuyo contenido de grasa fue del 7 g/100 g de dieta control (7%) y 15 g/100 g de dieta experimental (15%).

A los 28, 35 y 49 días de edad se sacrificaron 10 animales de cada grupo para la determinación de la composición corporal. A los 70 días de edad, 10 ratas de ambos grupos se aparearon y a los 110 días se destetaron las crías. Las madres de esta primera generación ($M_{1/7\%}$ y $M_{1/15\%}$) y un subgrupo de crías ($C_{1/7\%}$ y $C_{1/15\%}$) se sacrificaron. El subgrupo

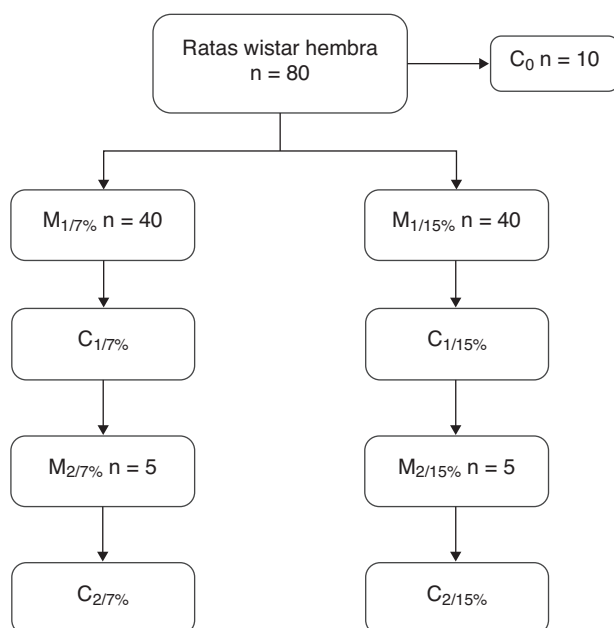


Figura 1 Diseño del procedimiento seguido en el estudio. M_1 : primera generación de madres; M_2 : segunda generación de madres. C_0 : grupo basal; C_1 : crías de la primera generación; C_2 : crías de la segunda generación. Los porcentajes de 7 y 15% indican el contenido de 7 g de grasa/100 g de dieta y 15 g de grasa/100 g de dieta, respectivamente.

restante continuó con la dieta de la generación anterior. A los 70 días fueron apareadas y las crías se destetaron a los 110 días de edad. Las madres ($M_{2/7\%}$ y $M_{2/15\%}$) y las crías ($C_{2/7\%}$ y $C_{2/15\%}$) fueron sacrificadas (fig. 1).

Durante el período experimental los animales recibieron a libre demanda una de las siguientes dietas isocalóricas (4 kcal/g) cuya composición se detalla en la tabla 1. El agua de bebida se administró en condiciones de libre demanda asegurando el suministro continuo, dada la estrecha correlación entre la ingesta de líquido y la conducta alimentaria¹².

Tabla 1 Composición porcentual de las dietas

	CONTROL	EXPERIMENTAL
Caseína ^a	28,7	28,7
Aceite de maíz	7,0	15,0
Dextrina de maíz	55,0	37,0
Mezcla de minerales AIN-93 ^b	3,5	3,5
Mezcla de Vitaminas AIN-93 ^c	1,0	1,0
Cloruro de Colina	0,71	0,71
Salvado de avena	4,1	14,1

^a Caseinato de potasio: 87% de proteína (Inmobal Nutrer SA. Argentina).

^b Mezcla de sales: AIN-93G Mineral Mix. AIN-93 (ICN Biomedicals Inc. Ohio, EE.UU.): (AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents for growth, pregnancy and lactational phases).

^c Mezcla de vitaminas: AIN-93-VX (ICN Biomedicals Inc. Ohio, EE.UU.). (AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents).

Parámetros evaluados

Peso corporal: para su medida se utilizó una balanza analítica Metler PC 4000 con una precisión de ± 1 mg. Las determinaciones se realizaron con un ayuno previo mínimo de 2 horas y máximo de 4 horas. El peso se expresó en gramos.

Composición corporal: el análisis de la composición corporal incluyó el contenido de grasa corporal (% Gra) y el contenido mineral óseo de esqueleto total (expresado como CMO% (g/100 g de peso). El contenido de grasa corporal se determinó por método químico sobre la carcasa seca mediante la extracción intermitente con éter de petróleo (Soxhlet, AOAC)¹³, expresándose los resultados en g de grasa/100 g de peso corporal. El contenido mineral óseo de esqueleto total se evaluó por densitometría *ex vivo* mediante la utilización de un equipo Lunar DPX (DPX Alpha 8034, Small Animal Software, Lunar Radiation Corp. Madison EE.UU.). La precisión del equipo se obtuvo mediante la medición de una misma rata cinco veces con reposición del animal durante el mismo y diferente día. El coeficiente de variación (CV) fue de 3% para el contenido mineral óseo (CMO%).

Los resultados se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron estadísticamente por ANOVA para comparar los grupos. Cuando se encontró una diferencia estadísticamente significativa se realizó la prueba de Student-Newman-Keul. En todos los casos se realizaron las pruebas de normalidad (Wilk-Shapiro) y de homoscedasticidad (Bartlett) de las varianzas. Los resultados se consideraron significativos a un nivel del 5%. Los programas empleados fueron el GraphPad Prism versión 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) y el SPSS versión 9.0 (SPSS, Inc., de Chicago, EE. UU.).

Resultados

Al analizar la evolución del peso corporal de los grupos $M_{1/15\%}$ (fig. 2a) y $M_{2/15\%}$ (fig. 2b) a lo largo del período experimental, no se observaron diferencias significativas entre los mismos y sus respectivos controles a 28, 35, 49, 70 y 90 días de edad. A los 110 días de edad, solo se observó un incremento significativo del peso corporal en el grupo $M_{2/15\%}$ vs. $M_{2/7\%}$ ($p < 0,05$).

El peso corporal de la crías al destete de la primera ($C_{1/7\%}$, $C_{1/15\%}$) y segunda ($C_{2/7\%}$, $C_{2/15\%}$) generaciones se muestra en la figura 3. Se observa un incremento significativo del peso corporal en la segunda generación de crías ($C_{2/15\%}$) provenientes de madres ($M_{2/15\%}$) que recibieron una dieta con un contenido de grasa del 15%. No se observaron modificaciones significativas en el peso corporal de las crías alimentadas con la dieta control a lo largo de las generaciones ($p > 0,05$).

El contenido de grasa corporal resultó significativamente mayor en $M_{1/15\%}$ y $M_{2/15\%}$ en comparación a sus respectivos controles a los 110 días de edad ($p < 0,001$) (fig. 4).

Al analizar la grasa corporal de las crías de la primera y segunda generación al destete, se observó que la misma fue significativamente mayor en $C_{1/15\%}$ y en $C_{2/15\%}$ procedentes de madres ($M_{1/15\%}$ y $M_{2/15\%}$) que recibieron una dieta con un contenido de grasa del 15%. No se observaron modificaciones significativas en grasa corporal de las crías alimentadas

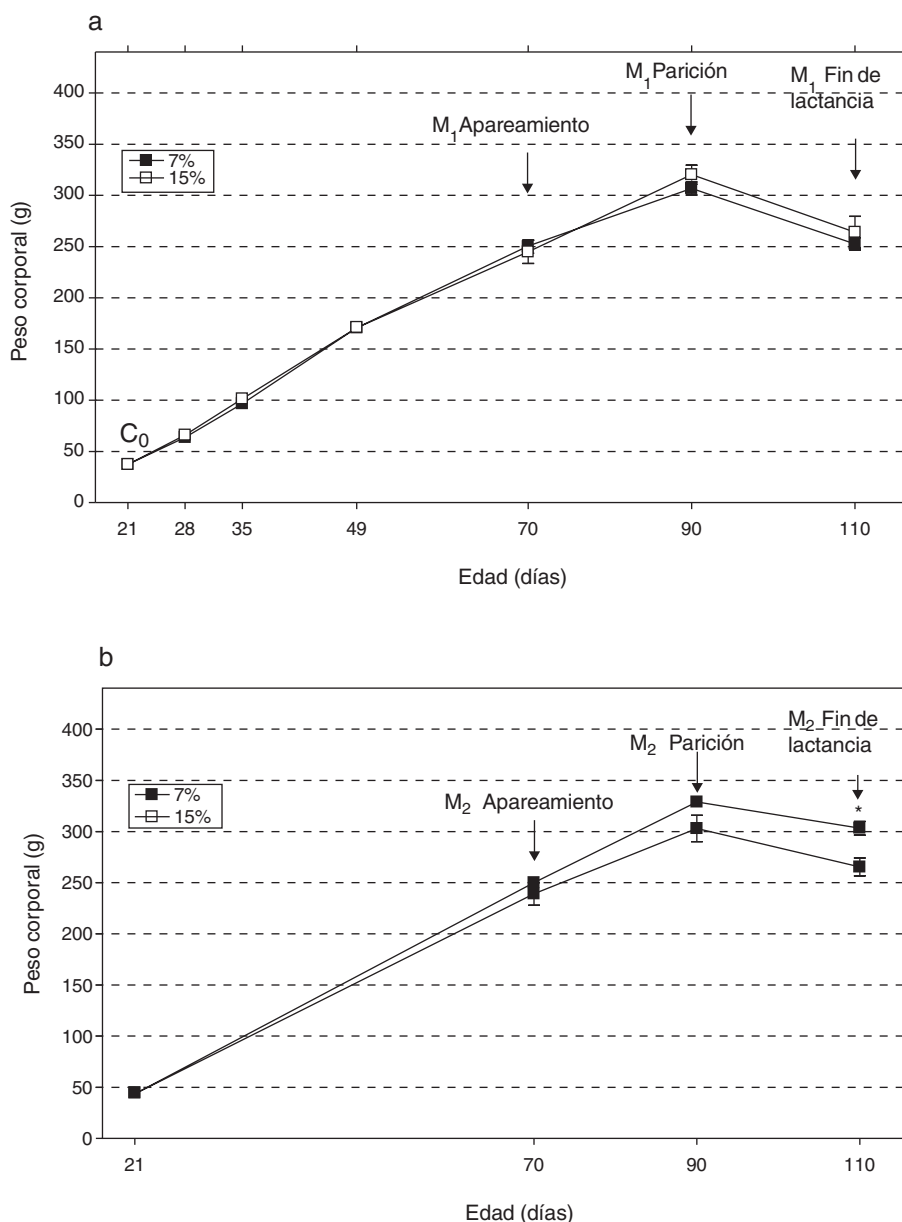


Figura 2 Evolución del peso corporal (media \pm error estándar) en función de la edad a lo largo de dos generaciones (1a: primera generación; 1b: segunda generación), correspondiente a animales alimentados con dieta 7% (grupo control) o 15% (grupo experimental) de grasa.

C₀: grupo basal; M₁: primera generación de madres; M₂: segunda generación de madres.

$p < 0,05$ entre grupo control y experimental.

con la dieta control a lo largo de las generaciones ($p > 0,05$) respecto de C₀ ($7,66 \pm 1,42\%$) (fig. 5).

La evolución del contenido mineral óseo de esqueleto total se muestra en las figuras 6 y 7. Si bien no se observaron diferencias significativas en las madres M_{1/15%} vs. M_{1/7%} y entre sus respectivas crías (C_{1/15%} vs. C_{1/7%}), el CMO de M_{2/15%} vs. M_{2/7%} y de C_{2/15%} vs. C_{2/7%} disminuyó significativamente ($p < 0,001$).

Discusión

En estudios previos, nuestro grupo de trabajo analizó el efecto de dietas isocalóricas con diferentes niveles de grasa

y carbohidratos sobre la composición corporal en ratas en crecimiento a lo largo de una generación¹⁴. Sin embargo, no se ha evaluado aún el efecto de dichas dietas, ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-6 (AGPI n-6), y las posibles modificaciones de la composición corporal, a lo largo de dos generaciones. Existe evidencia que demuestra que la exposición materna a dietas ricas en colesterol y grasa produce cambios epigenéticos que modulan la expresión de genes con desarrollo de obesidad en la progenie¹⁵.

Al comparar los pesos corporales en cada una de las generaciones, siempre resultó mayor en los grupos que consumieron dietas con mayor contenido de lípidos, tanto en madres como en crías¹⁶. El aumento del peso fue

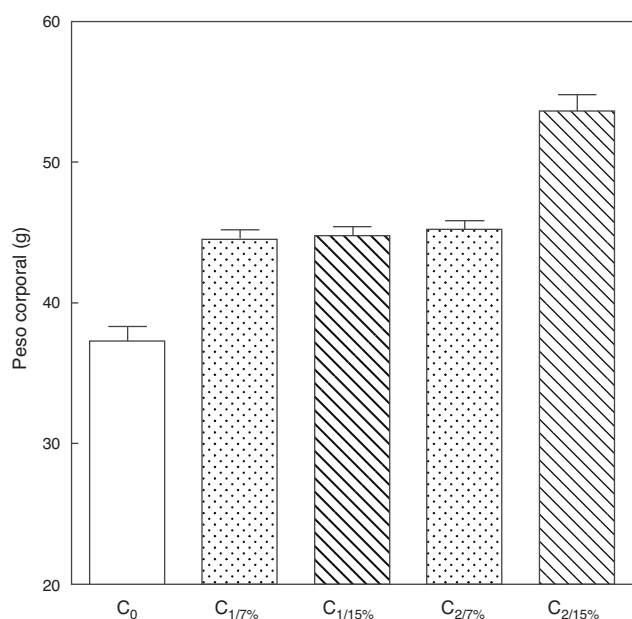


Figura 3 Peso corporal de las crías correspondiente a dos generaciones de ratas alimentadas con un contenido de grasa en la dieta de 7% (grupo control) o de 15% (grupo experimental). C₀: grupo basal; C₁: crías de la primera generación; C₂: crías de la segunda generación.

Media \pm error estándar

ANOVA, nivel de significación global <0.001 ; a posteriori la prueba de Student-Newman-Keul determinó las siguientes diferencias entre grupos (letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos):

Co vs. C_{1/7%} vs C_{1/15%}; $p < 0.05$; Co vs. C_{2/7%}; $p < 0.01$; Co vs. C_{2/15%}; $p < 0.001$; C_{1/7%} vs. C_{2/7%}; $p > 0.05$; Co vs. C_{2/15%}; $p < 0.001$; C_{1/15%} vs. C_{2/7%}; $p < 0.05$; C_{1/15%} vs. C_{2/15%}; $p < 0.001$; C_{2/7%} vs. C_{2/15%}; $p < 0.001$.

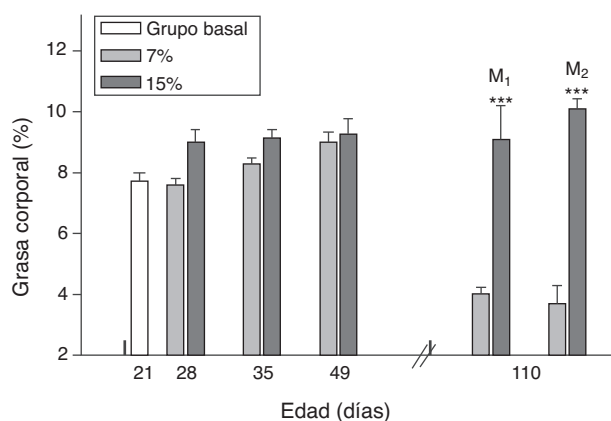


Figura 4 Grasa corporal (media \pm error estándar) en función de la edad en animales alimentados con dieta 7% (grupo control) o 15% (grupo experimental) de grasa.

C₀: grupo basal; M₁: primera generación de madres; M₂: segunda generación de madres. T-test entre grupos para cada tiempo experimental. Diferencias entre los grupos indicados: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

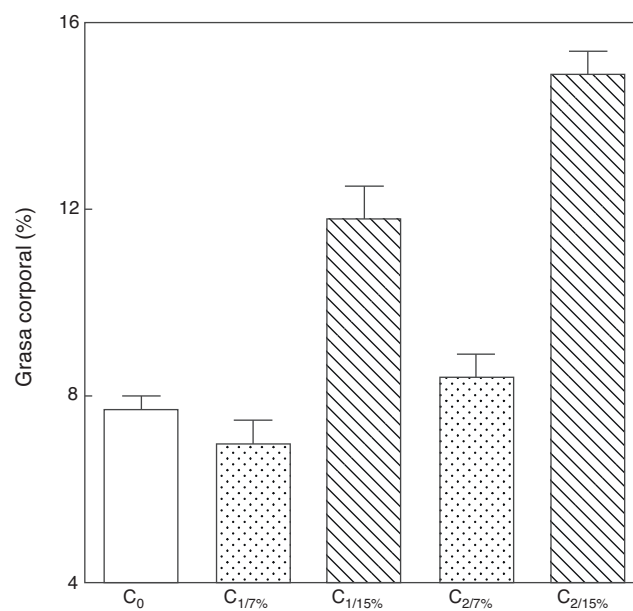


Figura 5 Grasa corporal de las crías correspondiente a dos generaciones de ratas alimentadas de ratas alimentadas con un contenido de grasa en la dieta de 7% (grupo control) o de 15% (grupo experimental).

C₀: grupo basal; C₁: crías de la primera generación; C₂: crías de la segunda generación.

Media \pm error estándar.

ANOVA, nivel de significación global <0.001 ; a posteriori la prueba de Student-Newman-Keul determinó las siguientes diferencias entre grupos (letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos):

Co vs. C_{1/7%} vs. C_{2/7%}; $p > 0.05$; Co, C_{1/7%}, C_{2/7%} vs. C_{1/15%}; $p < 0.001$; Co, C_{1/7%}, C_{2/7%} vs. C_{2/15%}; $p < 0.001$; C_{1/15%} vs. C_{2/15%}; $p < 0.001$.

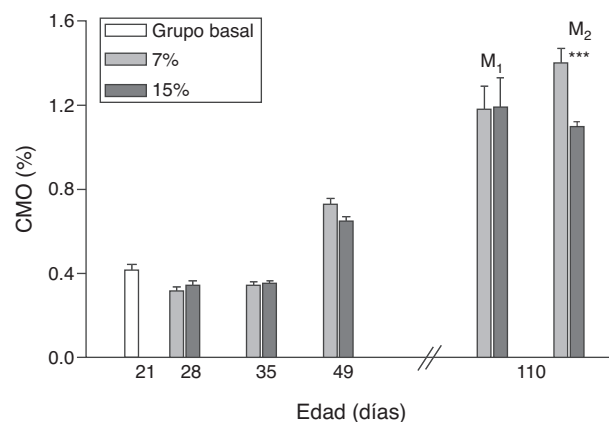


Figura 6 Contenido mineral óseo (CMO) de esqueleto total (media \pm error estándar) en función de la edad, correspondiente a animales alimentados con dieta 7% (grupo control) o 15% (grupo experimental) de grasa.

C₀: grupo basal; M₁: primera generación de madres; M₂: segunda generación de madres.

T-test entre grupos para cada tiempo experimental: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

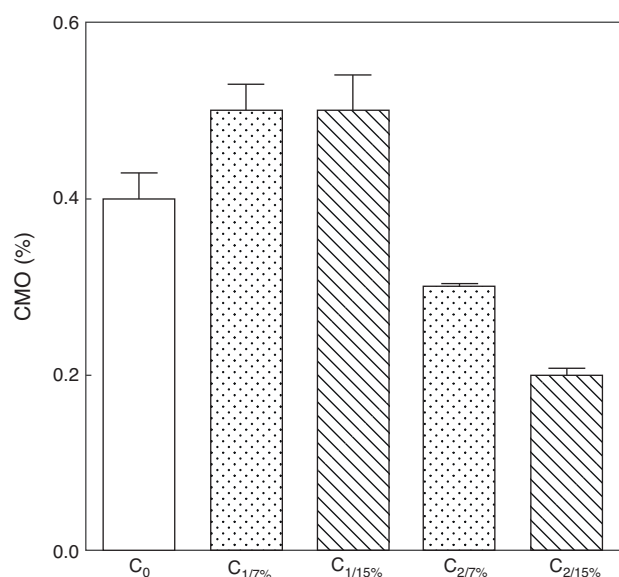


Figura 7 Contenido mineral óseo de esqueleto total de las crías correspondiente a dos generaciones de ratas alimentadas con un contenido de grasa en la dieta de 7% (grupo control) o de 15% (grupo experimental).

C₀: grupo basal; C₁: crías de la primera generación; C₂: crías de la segunda generación.

Media \pm error estándar

ANOVA, nivel de significación global <0.001 ; a posteriori la prueba de Student-Newman-Keul determinó las siguientes diferencias entre grupos (letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos):

Co vs. C_{1/7%} vs. C_{1/15%}; $p > 0.05$; Co, C_{1/7%}, C_{1/15%} vs. C_{2/7%}; $p < 0.001$; Co, C_{1/7%}, C_{1/15%} vs. C_{2/15%}; $p < 0.001$; C_{2/7%} vs. C_{2/15%}; $p < 0.01$.

acompañado de un incremento en el porcentaje de grasa corporal. Esto podría deberse específicamente al desequilibrio en la relación n-6/n-3 a favor de los AGPI n-6 y sus metabolitos; entre ellos, el ácido araquidónico que actúa como potente agente adipogénico precursor de prostacinas, aumentando el riesgo de desarrollo excesivo de tejido adiposo¹⁷. Otros autores observaron un incremento del tejido adiposo blanco inguinal y en el tamaño de los adipocitos ya en la primera generación¹⁸, en concordancia con nuestros resultados que evidencian el impacto en la primera generación que se incrementa en la segunda generación.

El desequilibrio en la relación de los n-6/n-3 y la menor presencia de los AGPI n-3 en el aceite de maíz podrían justificar el incremento de peso y grasa corporales en los animales con dieta experimental. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores que observaron que un aumento en la ingesta materna de AGPI n-3 conduciría a una reducción de la masa de tejido adiposo en ratas¹⁸ y en ratones¹⁹. Es sabido que la presencia de los AGPI n-6 en cantidades adecuadas resulta beneficiosa sobre la actividad ósea²⁰ y en la formación de cartílago de crecimiento²¹.

En el presente estudio, el consumo de la dieta rica en AGPI n-6 mostró una disminución en el %CMO, el cual guardó una relación inversa con la grasa corporal, tanto en las madres como en las crías de la segunda generación. La reducción en el %CMO podría deberse al incremento

en la producción de ácido araquidónico, el cual induciría un aumento de prostaglandina E₂ en hueso y una disminución sérica del factor de crecimiento insulínico-I^{22,23}, con la consecuente reducción de la tasa de formación ósea²⁴. Contrariamente, las dietas ricas en AGPI n-3, promueven la formación ósea al mantener en el hueso una adecuada concentración de ácido araquidónico²³.

El incremento del contenido de lípidos de la dieta, acompañado por un aumento en la grasa corporal, no se vio reflejado en modificaciones del CMO% de las madres y en las crías de la primera generación; en las madres, podría deberse a la preservación de la masa ósea a expensas de una menor velocidad de recambio óseo²⁵.

Estudios en animales de experimentación han demostrado que la exposición a dietas ricas en grasa durante el embarazo y la lactancia predisponen a la cría a desarrollar un fenotipo análogo al síndrome metabólico, y a disfunción endotelial y cardiovascular, entre otras patologías¹⁵. Alteraciones en la composición corporal podrían inducir al desarrollo de patologías²⁴⁻²⁷, tales como accidente cerebrovascular²⁸⁻³⁰, cáncer³¹⁻³³, enfermedades inflamatorias y autoinmunes^{34,35}, y enfermedades óseas³⁶. Pequeños cambios en los hábitos alimentarios como el simple agregado de ácido α -linolénico permitiría la reducción de la masa grasa por supresión de la lipogénesis^{37,38}.

Conscientes de la importancia de los patrones culturales en la calidad de vida del individuo y que es de destacar que el aceite de maíz constituye un componente importante en la dieta de la población argentina³⁹, este estudio demuestra la potencial necesidad de modificar ciertos hábitos alimentarios que eviten repetir patrones distorsionados de generación en generación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Ricardo Orzuza, técnico de Bioterio por el cuidado de los animales y su soporte técnico. Este trabajo ha sido subsidiado por UBACyT 20020100100613 y C 002.

Bibliografía

- Hauser GJ, Chitayat D, Berns L, Braver D, Muhlbauer B. Peculiar Odours in Newborns and Maternal Prenatal Ingestion of Spicy Foods. *Eur J Pediatr*. 1985;144:403.
- Mennella JA, Johnson A, Beauchamp GK. Garlic Ingestion by Pregnant Women Alters the Odor of Amniotic Fluid. *Chem Senses*. 1995;20:207-9.
- Schaal B, Marlier L, Soussignan R. Human Foetuses Learn Odours from their Pregnant Mother's Diet. *Chem Senses*. 2000;25:729-37.
- Mennella JA, Coren P, Jagnow MS, Beauchamp GK. Prenatal and Postnatal Flavor Learning by Human Infants. *Pediatrics*. 2001;107:88-94.
- Savage JS, Jennifer Orlet Fisher Leann L. Birch Parental Influence on Eating Behavior: Conception to Adolescence. *J Law Med Ethics*. 2007;35:22-34.

6. Lifshitz F. Children on adult diet. *Bibl Nutr Dieta*. 1996;53:55–9. Review.
7. Friedman SM, Rodriguez PN, Boyer PM, Lifshitz F. Decreased energy expenditure - an adaptive mechanism of nutritional growth retardation. *Nutr Res*. 2006;26:345–9.
8. Rising R, Lifshitz F. Relationship between maternal obesity and infant feeding-interactions. *Nutr J*. 2005;4:17.
9. Canani RB, Di Costanzo M, Leone L, Bedogni G, Brambilla P, Cianfarani S, et al. Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. *Nutr Res Rev*. 2011;1:8, doi:10.1017/S09544224110001020.
10. National Institutes of Health Laboratory animal welfare. Public Health Service policy on humane care and use of laboratory animals by awardees institutions. 1985, revised 1990. NIH "Guidelines for the care and use of laboratory animals".
11. NRC. National Research Council. Committee on the guide for laboratory animals facilities and care. Guide for laboratory facilities and care. Washington DC: Department of Health, Education and Welfare. National Academy of Sciences. US. Government Printing Office; 1965.
12. Mercer P, Bukhardt SS. The relationship between food intake, weight gain and dietary nutrient concentration in the rat. *Nutr Rep Int*. 1982;26:121–9.
13. AOAC. Official methods for analysis. 15th ed Washington DC: US Government Printing Office; 1990.
14. Gamba C, Friedman S, Rodriguez P, Macri E, Vacas M, Lifshitz F. Metabolic status in growing rats fed isocaloric diets with increased carbohydrate-to-fat ratio. *Nutrition*. 2005;21:249–54.
15. Buckley AJ, Keseru B, Briody J. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism*. 2005;54:500–7.
16. Korotkova M, Gabrielsson B, Holmäng A, Larsson B, Hanson L, Strandvik B. Gender-related long-term effects in adult rats by perinatal dietary ratio of n-6/n-3 fatty acids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:R575–9.
17. Ailhaud G, Guesnet P, Cunnane S. An emerging risk factor for obesity: does disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism contribute to excessive adipose tissue development. *Br J Nutr*. 2008;100:461–70.
18. Korotkova M, Gabrielsson B, Lönn M, Hanson L, Strandvik B. Leptin levels in rat offspring are modified by the ratio of linoleic to alpha-linolenic acid in the maternal diet. *J Lipid Res*. 2002;43:1743–9.
19. Massiéra F, Saint-Marc P, Seydoux J, Murata T, Kobayashi T, Narumiya S, et al. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern. *J Lipid Res*. 2003;44:271–9.
20. Corwin R. Effects of dietary fats on bone health in advanced age. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2003;68:379–86.
21. Xu H, Watkins BA, Adkisson HD. Dietary lipids modify the fatty acid composition of cartilage, isolated chondrocytes and matrix vesicles. *Lipids*. 1994;29:619–25.
22. Watkins BA, Shen CL, Allen KG, Seifert MF. Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated and acetylsalicylic acid alter *ex vivo* PGE2 biosynthesis, tissue IGF-I levels, and bone morphometry in chicks. *J Bone Miner Res*. 1996;11:1321–32.
23. Watkins B, Li Y, Lippman H, Seifert M. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Skeletal Health. *Exp Biol Med* Vol. 2001;226:485–97.
24. Watkins BA, Li Y, Allen KG, Hoffmann WE, Seifert MF. Ratio of (n-6)/(n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Alters the Fatty Acid Composition of Bone Compartments and Biomarkers of Bone Formation in Rats. *J Nutr*. 2000;130:2274–84.
25. Zeni SN, Weisstaub S, Di Gregorio S, Ronaine de Ferrer P, De Portela ML. Bone mass changes in vivo during the entire reproductive cycle in rats feeding different dietary calcium and calcium/phosphorous ratio content. *Calcif Tissue Int*. 2003;73:594–600.
26. Simopoulos A. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002;56:365–79.
27. Hibbeln J, Nieven L, Blasbag T, Riggs J, Lanas W. Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:1483S–93S.
28. Wang C, Chung M, Lichtenstein A. Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Evid Rep Technol Assess*. 2004;94:1–8.
29. Ramsden CE, Hibbeln JR, Majchrzak SF, Davis JM. n-6 fatty acid-specific and mixed polyunsaturated dietary interventions have different effects on CHD risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Nutr*. 2010;104:1586–600.
30. Zeghichi-Hamri S, De Lorgeril M, Salen P, Chibane M, De Leiris J, Boucher F, et al. Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats. *Nutr Res*. 2010;30:849–57.
31. Lou YR, Peng QY, Li T, Medvecky CM, Lin Y, Shih WJ, Conney AH, Shapses S, Wagner GC, Lu YP. Effects of high fat diets rich in either omega-3 or omega-6 fatty acids on UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice. *Carcinogenesis*. 2011;32:1078–84.
32. Williams CD, Whitley BM, Hoyo C, Grant DJ, Iraggi JD, Newman KA, et al. A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. *Nutr Res*. 2011;31:1–8.
33. Murff HJ, Shu XO, Li H, Yang G, Wu X, Cai H, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2011;128:1434–41.
34. MacLean CH, Mojica WA, Morton SC, Pencharz J, Hasenfeld Garland R, Tu W, et al. Effects of omega-3 fatty acids on lipids and glycemic control in type II diabetes and the metabolic syndrome and on inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, renal disease, systemic lupus erythematosus, and osteoporosis. *Evid Rep Technol Assess*. 2004;89:1–4.
35. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:563–73.
36. Maggio M, Artoni A, Lauretani F, Borghi L, Nouvenne A, Valenti G, et al. The impact of omega-3 fatty acids on osteoporosis. *Curr Pharm Des*. 2009;15:4157–64.
37. Willumsen B, Hexeberg S, Skorve J, Lundquist M, Berge R. Docosahexaenoic acid shows no triglyceride-lowering effects but increases the peroxisomal fatty acid oxidation in liver of rats. *J Lipid Res*. 1993;34:13–22.
38. Ukropec J, Reseland J, Gasperikova D, Demcakova E, Madsen L, Berge R, et al. The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased β -oxidation and reduced leptin expression. *Lipids*. 2003;38:1023–9.
39. Friedman S, Rodriguez P, Portela ML, Riba Sicart M, Almajano Pablos MP. Estudio comparativo entre los hábitos alimentarios de estudiantes universitarios argentinos y catalanes: aspectos nutricionales. *Revista española de Nutrición Comunitaria*. 2008;14:210–8.