Estudio metabonómico de hígado, músculo y grasa abdominal de pollos alimentados con dietas de diferente grado de insaturación mediante técnicas de *RMN*

G. GONZÁLEZ-ORTIZ[1], P. NOLIS[2], A. CONTRERAS-JODAR[1], E. G. MANZANILLA[1], R. SALA[1], T. PARELLA[2] Y A.C. BARROETA[1]*

[1] Servei de Nutrició i Benestar Animal. Dpt. Ciència Animal i dels Aliments.

[2]Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona campus UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona.

*ana.barroeta@uab.cat

RESUMEN

En el área de nutrición, está bien establecido que el tipo de grasa que compone la ración repercute de forma directa sobre el depósito de grasa en el organismo. En el caso del pollo de carne, se ha demostrado que la grasa consumida influye sobre el perfil lipídico de los tejidos y que la inclusión de dietas ricas en ácidos grasos insaturados reduce la cantidad de grasa depositada en comparación con las dietas ricas en ácidos grasos saturados. Existen numerosas hipótesis pero, hasta el momento, no se ha demostrado cual es el mecanismo responsable de estos cambios. La metabonómica estudia las perturbaciones o cambios a nivel metabólico de células, biofluidos o tejidos causados por un factor externo, como puedan ser cambios dietéticos, ingesta de toxinas, procesos patológicos, etc. Estudios de Resonancia magnética Nuclear (RMN) mediante técnicas de HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning) permiten obtener el perfil metabólico de muestras intactas de tejido sin necesidad de una manipulación y/o extracción previa. Debido a la complejidad de los datos obtenidos se requiere de técnicas de análisis estadístico multivariante para la extracción de conclusiones estadísticamente representativas. La hipótesis principal es que debido a la alimentación con dos fuentes distintas de grasa habrá una variación en el perfil metabólico de los diferentes tejidos. Concretamente, en este estudio, se han analizado por HRMAS muestras de hígado, músculo y grasa abdominal de pollos de carne de 35 días de edad, alimentados con dos dietas experimentales (5 animales por tratamiento) que diferían en el tipo de grasa añadida al 10%: saturada (sebo) o poliinsaturada rica en omega-3 (aceite de linaza + aceite de pescado 70:30). Se han determinado los metabolitos que cambian según la grasa consumida, evaluándose no solo el perfíl lipídico sino también otros componentes principales que se alteran como aminoácidos y/o azucares.

Palabras clave: pollos de carne; grasas; metabonómica; RMN; HRMAS.

ABSTRACT

In the area of nutrition, it is well established that the type of fat that makes up the diet has a direct impact on the fat deposition in the body. In the case of chicken meat, it has described that fat consumed influences tissues' lipid profile and that the inclusion of diets rich in unsaturated fatty acids reduces the amount of fat compared with diets rich in saturated fatty acids. There are many hypotheses, but so far not been shown what the mechanism responsible for this change is. Metabonomics studies disturbances or changes in metabolic rate of cells, biofluids and tissues caused by an external factor, such as dietary changes, dietary toxins, disease processes, etc. Magnetic resonance imaging studies (MRI) techniques by means of HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning) allow the metabolic profile of intact tissue samples without requirement for handling and / or prior extraction. Due to the complexity of the data requires multivariate statistical analysis techniques to extract statistically representative

conclusions. The main hypothesis is that due to the feeding of two different sources of fat will be a variation in the metabolic profile of different tissues. Specifically, in this study were analyzed by HRMAS samples of liver, muscle and abdominal fat of broilers 35 days of age, fed two experimental diets (5 animals per treatment) that differed in the type of fat added to 10 % saturated (tallow) or polyunsaturated fat rich in omega-3 (flaxseed oil fish oil + 70:30). Metabolites have been identified that change depending on the fat consumed, evaluating not only the lipid profile but also other major components that are altered amino acids and / or sugars.

Keywords: *chicken meat; fat; metabonomic; NMR; HRMAS.*

INTRODUCCIÓN

En el área de nutrición animal, está bien establecido que el tipo de grasa de la ración repercute de forma directa sobre el depósito de grasa en el organismo. En el caso del pollo de carne, se ha demostrado que la grasa consumida influye sobre el perfil lipídico y la cantidad de grasa depositada en los tejidos (Villaverde et al., 2006; Ferrini, 2009). Pollos alimentados con dietas ricas en ácidos grasos insaturados presentan un menor contenido de grasa corporal y un perfil enriquecido en este tipo de ácidos grasos comparados con pollos alimentados con el mismo nivel de energía metabolizable en base a grasas saturadas o moniinsaturadas. Existen numerosas hipótesis pero no se han descrito totalmente los mecanismos responsables de estos cambios. Ante la evidencia de los efectos metabólicos en el organismo de las aves bajo diferentes condiciones dietéticas, parece de interés estudiar mediante nuevas técnicas, como la espectroscopia por resonancia magnética nuclear, las variaciones a nivel metabólico en los diferentes tejidos para intentar elucidar posibles vías involucradas.

En los últimos años la aplicación de la metabonómica se ha extendido en el campo de la biociencia con el fin de identificar cambios en el perfil metabólico final de muestras biológicas combinando técnicas como la espectroscopia por resonancia magnética nuclear y un patrón de reconocimiento de metabolitos por análisis multivariante. El perfil metabolómico permite reconocer una multitud de metabolitos hidrosolubles y liposolubles además de semicuantificar metabolitos una vez ya identificados. Las características más interesantes de esta herramienta analítica son la escasa manipulación de la muestra, la excelente resolución del perfil de metabolitos, la elevada reproducibilidad especialmente de mezclas complejas y el bajo coste que supone analizar una muestra. Actualmente, es posible obtener el perfil metabolómico de cualquier biofluido (Beckonert et al., 2007) y de muestras intactas de tejido mediante la técnica de HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*) sin necesidad de una manipulación y/o extracción previa (Beckonert et al., 2010; Griffin et al., 2001; Martinez-Granados et al., 2006). Los principales tejidos en los que se ha aplicado esta técnica son en hígado (Martinez-Granados et al., 2006), musculatura (Griffin et al., 2001) e intestino (Martin et al., 2007), sin embargo en la bibliografía no hemos encontrado estudios del perfil de metabolitos en tejidos graso. Recientemente, varios grupos de investigación han utilizado la RMN como herramienta para el estudio de los lípidos, con el objetivo de comparar los resultados de espectroscopía con los de cromatografía de gases (Yeung et al., 2008) y para evaluar cambios de metabolitos en modelos de obesidad (Cheng et al., 2010; He et al., 2011) y de hígado graso (Vinaixa et al., 2010).

Este trabajo forma parte del proyecto AGL2007-65898-C02-01 que pretende clarificar las diferentes rutas metabólicas implicadas en las diferencias de acumulación de grasa a partir de dietas con diferente contenido en ácidos grasos poliinsaturados. Con este objetivo general, el proyecto plantea un estudio del nivel de expresión de los posibles genes implicados (análisis transcriptómico) así como un análisis del perfil de metabolitos (análisis metabonómico) en diferentes tejidos. En el presente trabajo se presentan los primeros resultados del análisis metabonómico utilizando espectroscopia por resonancia magnética nuclear en una sola dimensión. En él se evalúan la capacidad de la técnica tanto analítica como estadística para separar los individuos en los respectivos grupos experimentales y se estudian las principales regiones de los espectros que determinan estas diferencias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 66 pollos broiler (estirpe Ross 308) hembras de 1 día de edad (Terra-Avant S.A., Anglés, Girona, Spain) se transportaron a las instalaciones del Servei de Granges i Camps Experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona donde se realizó el experimento aprobado por el Comité de Ética

en Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la UAB. Durante el periodo pre-experimental los animales se alojaron en corrales en condiciones de luz y temperatura controladas donde tuvieron libre acceso a una dieta comercial de inicio (19% PB, 5% EE). El día 15 de edad, los pollos fueron alojados en 12 jaulas a razón de 5 animales por jaula y distribuidos al azar en 2 tratamientos. Las dietas y el agua se administraron *ad libitum* durante todo el experimento.

Las dos dietas experimentales fueron formuladas en base a trigo y soja para cubrir o exceder las necesidades indicadas por FEDNA (2008). Ambas dietas, isoenergéticas (2,900 kcal/kg) e isoproteicas, mostraban como único factor de variación la fuente de grasa añadida. La dieta S contenía un 10% de sebo, rico en ácidos grasos saturados y la dieta N3 contenía un 10% de una mezcla de aceites de linaza y de pescado, rico en ácidos grasos polinsaturados. La composición, el análisis químico y el perfil de ácidos grasos de las dietas se detallan en la tabla 1.

A los 35 días de edad, se sacrificaron 6 pollos de cada tratamiento. Inmediatamente, se procedió a la obertura de la cavidad celómica y se muestrearon hígado, grasa abdominal y músculo *Sartorious* del muslo derecho. Las muestras se dispusieron en criotubos identificados por animal y se conservaron a -80ºC hasta el análisis de RMN.

En el análisis, todos los espectros se obtuvieron usando un espectrómetro de RMN Bruker Avance-III operando a una frecuencia de protón de 400 MHz y usando una sonda HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*) que permite obtener espectros de alta calidad en muestras heterogéneas. Todos los espectros fueron obtenidos a 4000 Hz de velocidad de giro y a una temperatura de 273K controlada por la unidad de termostatización BCU de Bruker. El procedimiento de preparación de las muestras se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Beckonert y colaboradores (2007). Con la ayuda de un bisturí y un punzón se introducía 20 mg de muestra en el interior del rotor de óxido de zirconio (ZrO_2) y se añadía 25 µl de D_2O que contenía 0.75% de TSP (trimetilsilil [2,2,3,3-^{2}H4] propionato). El TSP se utilizó como referencia interna y su señal se asigna a un desplazamiento químico de 0.00 ppm. El volumen que ocupaba la muestra quedaba fijado con un “insert” de un volumen de 50µl colocado dentro del rotor y tapado con un tapón de kel-F. En las muestras de hígado y músculo se registraron dos tipos de experimentos: un experimento 1D-NOESY de protón con presaturación del pico del agua durante el tiempo de mezcla y gradientes de purga, el cual permite ver el perfil espectral global de toda la muestra sin el pico de agua; y, un experimento 1D-DOSY con presaturación del pico del agua que utiliza un filtro de difusión que elimina del espectro aquellos metabolitos pequeños de alta movilidad, observándose pues, solo moléculas más pesadas cómo son los lípidos.

En el caso de la grasa abdominal únicamente se obtuvo el espectro de protón con un pulso de 90ºC. El análisis del perfil metabolómico se realizó por duplicado en todos los animales y en los tres tejidos. Todos los espectros fueron procesados como sigue: corrección de la fase, corrección de la línea base, ajuste de la línea base a intensidad cero y posterior tratamiento estadístico. Se excluyeron del análisis los puntos correspondientes al pico residual del agua y las regiones por encima de δ=9.50 ppm y por debajo de δ= -0.008 ppm. El tamaño de los picos se normalizó utilizando el área total bajo la curva y el número de picos se redujo utilizando segmentos de 0.006 ppm en el caso del espectro 1D-DOSY y de 0.012 ppm para el espectro 1D-NOESY. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS versión 9.2. Los datos se sometieron a un análisis de componentes principales usando la matriz de covarianzas para calcular los valores propios. A partir de la bibliografía consultada pudimos asignar las señales.

Tabla 1. Ingredientes, composición nutritiva y perfil de ácidos grasos de los piensos experimentales

Composición de ingredientes [g/kg alimento]			Perfil de ácidos grasos [%]		
	Dietas experimentales			Dietas experimentales	
	S	N3		S	N3
Trigo	55.3	55.3	14:0	3.01	0.23
Soja 48	31.1	31.1	16:0	23.90	6.86
Sebo	10	-	18:0	17.40	2.62
Aceite de linaza	-	7.5	18:1n-9	32.34	16.51
Aceite de pescado	-	2.5	18:2n-6	14.67	20.54
DL-Methionina	0.25	0.25	18:3n-3	1.62	33.58
L-Lisina	0.13	0.13	20:1n-9	0.23	0.99
Carbonato cálcico	1.30	1.30	20:2	0.00	0.20
Fosfato dicálcico	1.25	1.25	20:5n-3	-	8.56
Sal	0.32	0.32	20:6n-3	-	6.18
Mezcla vitamínica mineral	0.40	0.40	Total FA	107.38	106.66
	Análisis químico [%]		Total SFA	46.98	11.62
Materia seca	89.75	90.11	Total MUFA	36.73	19.13
Proteína Bruta	19.46	19.98	Total PUFA	16.29	69.25
Grasa Bruta	11.42	11.46	Total n-3	1.62	48.44
Fibra bruta	2.65	2.79	Total n-6	14.67	20.61
Cenizas	5.97	5.76	Total n-9	32.58	17.56
AME, kcal/ kg	3.587	3.651	n6:n3	9.05	0.43
Energía bruta, kcal/kg alimento	4.476	4.437	PUFA:SFA	0.35	5.96

Los valores resultan del promedio de dos determinaciones. S: dieta con 10% de sebo añadido; N3: dieta con 10% de aceite añadido rico en ácidos grasos insaturados (75% aceite de linaza; 25% aceite de pescado). Mezcla vitamínica mineral por kg de alimento: Vitamina A: 6.000 UI; Vitamina D3: 1.200 UI; Vitamina E: 10 mg; Vitamina K_3: 1.5 mg; Vitamina B1: 1.1 mg; Vitamina B2: 4 mg; Vitamina B6: 1.5 mg; Vitamina B12: 9 µg; Ácido fólico: 4 mg; Biotina: 50 µg; Ácido pantoténico: 6 mg; Ácido nicotínico: 21 mg; Colina: 360 mg; Mn:75 mg; Zn: 50 mg; I: 0.18 mg; Fe: 30 mg; Cu: 3 mg; Se: 0.2 mg; Co: 0.2 mg; Etoxiquin: 16 mg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación visual de los espectros de los tres tejidos puso en evidencia el distinto perfil de metabolitos obtenido para cada uno de ellos. En un análisis de componentes principales (CP) incluyendo los datos de los dos tratamientos y los tres órganos (hígado, músculo y grasa abdominal) para un mismo tipo de espectro, el primer CP correspondía en todos los casos al órgano del que procedía la muestra (datos no presentados) demostrando así la importancia de las diferencias en el perfil de metabolitos de los diferentes órganos. El segundo CP representaba las diferencias debidas a la dieta.

Figura 1. Asignación de señales en el espectro de ^{1}H MAS RMN 400 MHz (espectro 1-D; NOESYPRESAT) de muestras de hígado de pollo. Grupo de tratamiento S (a) y grupo de tratamiento N3 (b)

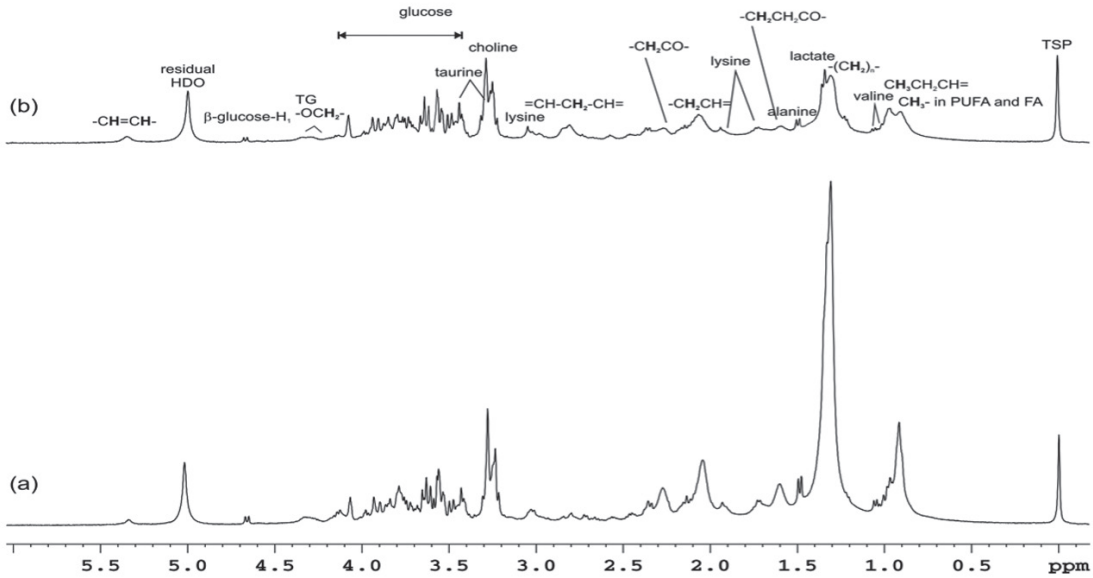
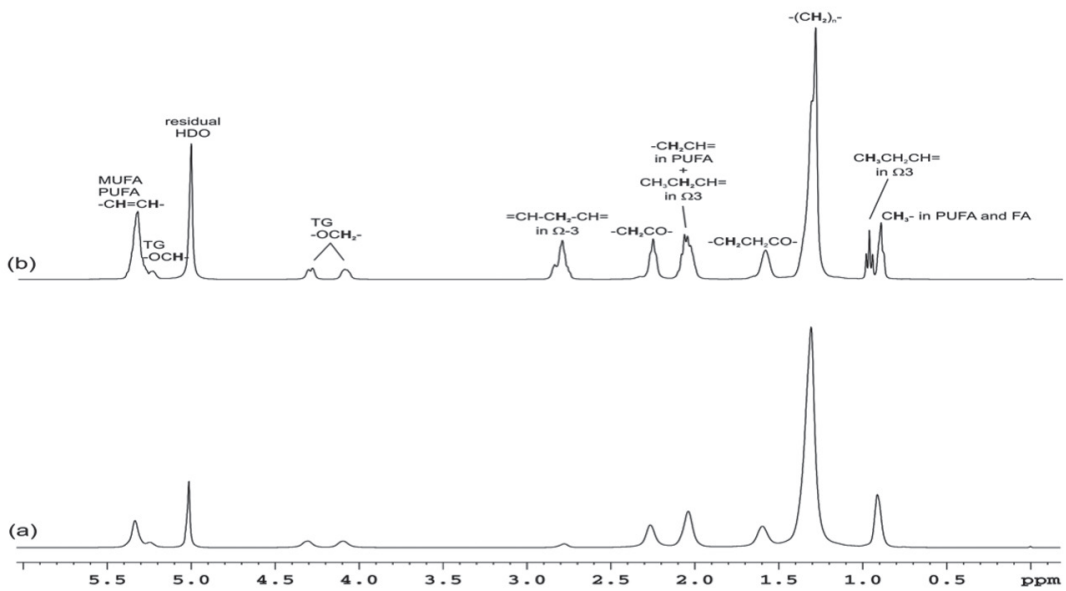
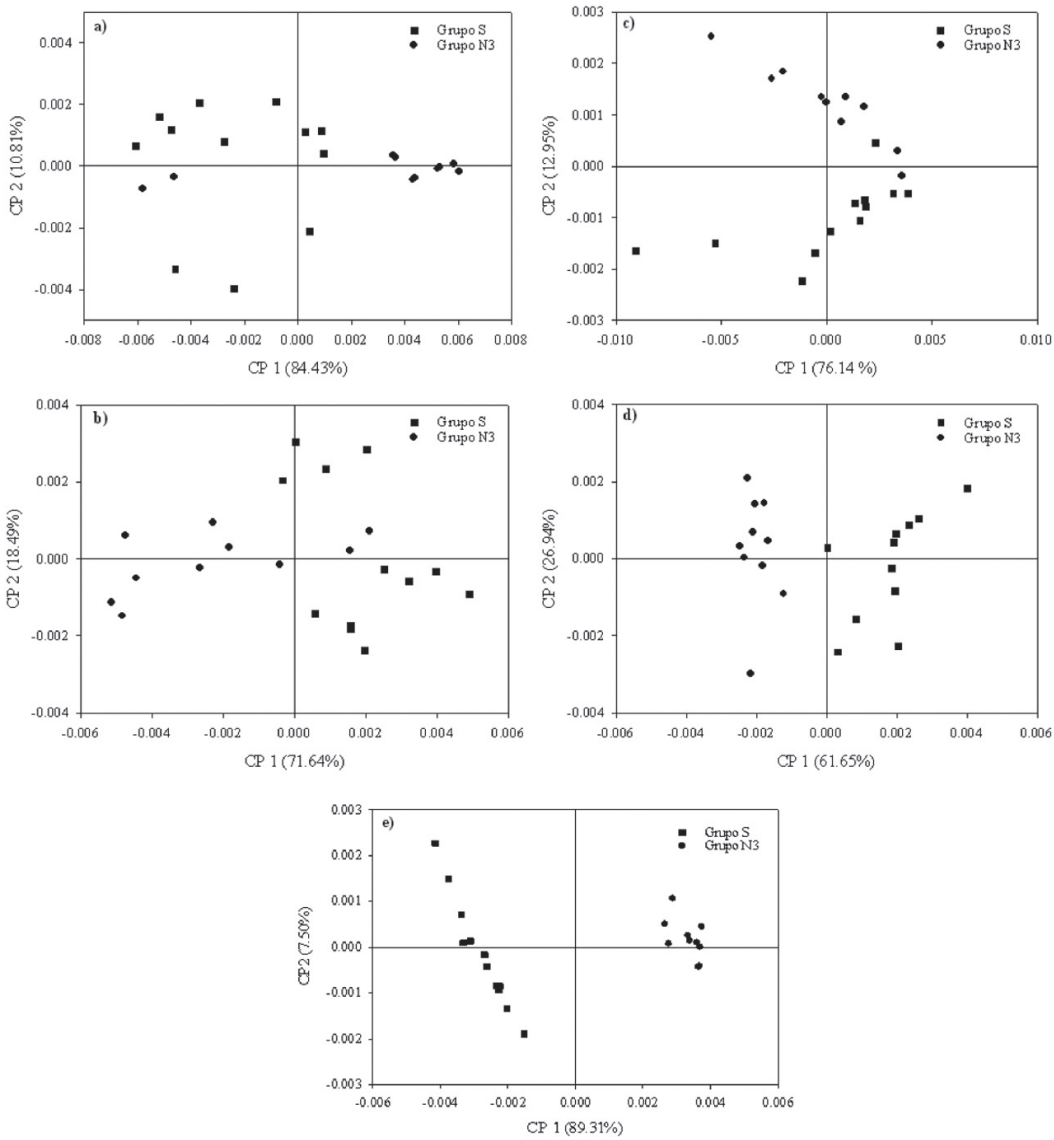


Figura 2. Asignación de señales en el espectro de ^{1}H MAS RMN 400 MHz (espectro 1-D; protón) de muestras de grasa abdominal de pollo. Grupo de tratamiento S (a) y grupo de tratamiento N3 (b)



En la figura 1 se presenta el espectro 1D-NOESY característico del hígado de los dos tratamientos. Este tipo de espectro representa el perfil metabolómico completo, mostrando metabolitos de alto y bajo peso molecular. En la figura 2 se muestran dos espectros de protón de grasa abdominal de diferentes tratamientos. Los espectros de la figura 1 muestran gran número de picos cuya asignación e identificación depende de la obtención de espectros de 2 dimensiones ^{1}H/^{13}C para intentar reconocer los picos de mayor interés. Los espectros de protón mostrados en la figura 2 presentan menor número de picos y todos ellos compatibles con metabolitos de naturaleza lipídica lo que facilita su reconocimiento y ayudan a la interpretación de los espectros obtenidos a partir del hígado y músculo donde la superposición y la densidad de otros compuestos son mayores.

Figura 3. Separación de las animales en función del perfil metabólico por componentes principales (PC) de los tres tejidos analizados por H MAS RMN 400 MHz. a) 1D-NOESY en hígado; b) 1D-DOSY en hígado; c) 1D-NOESY en músculo; d) 1D-DOSY en músculo; e) Espectro de protón en grasa abdominal



Tal y como se puede observar en las figuras 1 y 2, los espectros entre los dos grupos de tratamiento pusieron de manifiesto diferencias en el perfil de metabolitos como consecuencia de la dieta. Estos resultados macroscópicos se confirmaron al realizar el análisis de multivarianza por CP (figura 3). En las figuras se observa como el análisis de CP dio lugar a una separación clara entre tratamientos por el CP1 en todos los casos excepto para el espectro 1D-NOESY del músculo. La variabilidad observada en el espectro NOESY del hígado queda explicada en un 84% por el CP 1 y en un 11% por el CP 2. En el caso del espectro NOESY del músculo el 76% de la variabilidad queda explicada por el CP 1 y el 13% en el CP 2. Al aplicar el filtro de difusión en las muestras para la obtención del perfil lipídico (experimento 1D-DOSY) encontramos resultados menos contundentes en comparación con los resultados obtenidos del perfil global de metabolitos. Podríamos pensar que la aplicación del filtro de difusión puede eliminar del espectro algunos metabolitos de bajo peso molecular que podrían ser claves en la detección de diferencias estadísticas entre tratamientos. El CP 1 del espectro DOSY del hígado explica el 72% de la variabilidad observada mientras que el del análisis del músculo explica el 62%. En el caso del espectro de protón de la grasa abdominal el CP 1 explica el 89% de la variabilidad observada. Debido a la baja concentración de metabolitos en el espectro de la grasa abdominal, el análisis estadístico permite agrupar los animales de forma más evidente en función del grupo de tratamiento.

Finalmente se analizó que metabolitos componían el CP 1 en cada caso. En la tabla 2 se muestran los cinco metabolitos con mayor correlación con el CP 1 en cada sentido para cada uno de los órganos y cada uno de los espectros. Los coeficientes de correlación se expresan para cada una de las regiones obtenidas en el análisis de CP y sirven para determinar la magnitud y direccionalidad del cambio de los metabolitos de mayor interés.

Tabla 2. Picos mayoritarios y valores de correlación con el primer componente principal

	Músculo		Grasa abdominal	Hígado	
δ ^{1}H ppm	1D-NOESY	1D-DOSY	Espectro de ^{1}H	1D-NOESY	1D-DOSY
0.92	-0.109	0.136	-0.112	-0.095	0.108
0.97	-	-0.140	0.154	0.033	-0.059
1.26	-	-	-0-098	-	-0.057
1.29	-	-0.316	0.453	-	-
1.31	-0.522	0.300	-0.305	-0.512	0.385
1.33	-	0.210	-0.275	-	-
1.37	-0.081	-	-	-	-
1.60	-	0.016	-	-0.035	0.022
2.03	-	0.027	-0.034	-0.055	0.013
2.07	-0.078	-0.083	0.101	-	-
2.26	-0.060	-0.043	-	-0.035	0.018
2.80	-	-0.124	0.166	-	-0.060
3.03	0.160	-	-	-	-
3.24	0.065	-	-	0.055	-0.034
3.27	0.171	-	-	0.064	-0.034
3.43	-	-	-	0.035	-
3.55	-	-	-	0.044	-
3.85	0.055	-	-	-	-
3.94	0.107	-	-	-	-
5.33	-	-	0.169	-	-

-: No detectado

En todos los casos los picos entre 1.29 y 1.33 ppm presentan las correlaciones más altas con los primeros componentes principales. En el caso de la grasa, donde el espectro de una dimensión presenta pocas señales y bien definidas, varios picos correspondientes a ácidos grasos presentan correlaciones importantes con el primer CP. Este resultado confirma la validez de la técnica para obtener resultados similares a los obtenidos con otras técnicas como la cromatografía de gases pero de una manera más sencilla y con costes similares (Yeung et al., 2008). En el caso del espectro 1D-DOSY del músculo, se observan picos de importancia en las señales 0.92, 0.97 y 2.80 ppm, y en el espectro 1D-NOESY, son los picos 0.92, 3.03, 3.27 y 3.94 ppm en el CP 1 los que presentan mayor relevancia. Debido a que en el espectro 1D-NOESY de musculo, los dos grupos de tratamiento se separan por el CP 2, es importante destacar los picos de mayor correlación con este componente, los cuales son: 0.94, 0.99, 1.26, 1.41, 2.30, 2.61, 2.82, 4.08, 4.35, 4.41 y 5.34 ppm. En el caso del hígado la única señal con correlaciones importantes fue 0,92 ppm en ambos espectros. Las señales 0.92-0.94 0.97-0.99, 2.80-2.82 y 5.34 ppm corresponden también a protones pertenecientes a ácidos grasos y por tanto confirman la información hasta ahora conocida. Los picos 1.26, 1.41, 2.30, 2.61, 3.03, 3.27, 3.94, 4.08, 4.35 y 4.41 ppm corresponden en su mayoría a azúcares y aminoácidos y deben ser estudiadas con más detalle en espectros de 2 dimensiones ^{1}H/^{13}C que permitan separar los diferentes metabolitos que representan con mayor precisión. Además de los picos de interés en el presente análisis, algunas señales que no presentaron correlaciones altas con los primeros CP pueden aumentar su importancia en futuros análisis donde las señales comprendan segmentos mayores, o donde la magnitud de los picos tenga menos relevancia por procesos de estandarización como es el caso del análisis por PLS.

Como conclusión, la espectroscopia por resonancia magnética nuclear de una sola dimensión resulta tan útil como técnicas clásicas para estudiar diferencias en la composición corporal de los pollos alimentados con dietas que contienen diferentes fuentes de grasa. Además, aporta nueva información que puede ser estudiada en pasos sucesivos, como el uso de una segunda dimensión lo que ayudará a estudiar aquellos metabolitos involucrados en el metabolismo de las grasas.

REFERENCIAS

BECKONERT, O., COEN, M., KEUN, H. C., WANG, Y., EBBELS, T. M. D., HOLMES, E., LINDON, J. C., NICHOLSON, J. K. (2010) High-resolution magic–angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols* 5(6): 1019-1032.

BECKONERT, O., KEUN, H. C., EBBELS, T. M. D., BUNDY, J., HOLMES, E., LINDON, J. C., NICHOLSON, J. K. (2007) Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols* 2(11): 2692-2703.

CHENG, K. K., BENSON, G. M., GRIMSDITCH, D. C., REID, D. G., CONNOR, S. C. GRIFFIN, J. L. (2010) Metabolomic study of the LDL receptor null mouse fed a high-fat diet reveals profound perturbations in choline metabolism that are shared with ApoE null mice. *Physiol Genomics* **41:** 224-231.

FEDNA 2008 (2008) Necesidades nutricionales para avicultura: Pollos de carne y aves de puesta. Lázaro, R., Mateos, G.G. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.

FERRINI, G. (2009) Efecto del perfil en ácidos grasos de la ración sobre la cantidad y distribución de lípidos en el pollo de carne. *Tesis doctoral. http://tesisenred.net/bitstream/handle/10803/5711/gf1de1.pdf?sequence=1*

GRIFFIN, J. L., WILLIAMS, H. J., SANG, E., NICHOLSON, J. K. (2001) Abnormal lipid profile of dystrophic cardiac tissue as demonstrated by one- and two dimensional magic- angle spinning ^{1}H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 46: 249-255.

HE, Q., REN, P., KONG, X., WU, Y., WU, G., LI, P., HAO, F., TANG, H., BLACHIER, F., YIN, Y. (2011) Comparison of serum metabolite compositions between obese and lean growing pigs using an NMR-based metabonomic approach. *Journal of Nutritional Biochemistry (In press).*

MARTIN, F. P. J., WANG, Y., SPRENGER, HOLMES, E., LINDON, J. C., KOCHHAR, S., NICHOLSON, J. K. (2007) Effects of probiotic Lactobacillus paracasei treatment on the host gut tissue metabolic profiles probed via magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Journal of Proteome Research* 6: 1471-1481.

MARTÍNEZ-GRANADOS, B., MONLEÓN, D., MARTÍNEZ-BISBAL, M. C., RODRIGO, J. M., DEL OLMO, J., LLUCH, P., FERRÁNDEZ, A., MARTÍ-BONMATÍ, L., CELDA, B. (2006) Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning ^{1}H NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine* 19**:** 90-100.

YEUNG, D. K. W., LAM, S. L., Griffith, J. F., Chan, A. B. W., CHEN, Z., TSANG, P. H., LEUNG, P. C. (2008) Analysis of bone marrow fatty acid composition using high-resolution proton NMR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* 151**:** 103-109.

VILLAVERDE, C., BAUCELLS, M. D., CORTINAS, L., BARROETA, A. C. (2006) Effects of dietary concentration and degree of polyunsaturation of dietary fat on endogenous synthesis and deposition of fatty acids in chickens. *British Poultry Science 47(2):173-179.*

VINAIXA, M., RODRÍGUEZ, M. A., RULL, A., BELTRÁN, R., BLADÉ, C., BREZMES, J., CAÑELLAS, N., JOVEN, J., CORREIG, X. (2010) Metabolmic assessment of the effect of dietary colesterol in the progressive development of fatty liver disease. *Journal of Proteome Research* **9:** 2527-2538.