



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Carla Muyo Sanz

**CARACTERIZACIÓN LONGITUDINAL DE LA
COMPOSICIÓN DE MEMBRANA DE LAS CÉLULAS
SANGUÍNEAS DEL GANADO BOVINO**

Traballo Fin de Grao

Xuño 2024

Índice

Índice de figuras	3
Índice de tablas.....	5
Abreviaturas	6
Resumen	7
Resumo	8
Abstract	9
1. Introducción	10
1.1 Componentes celulares de la sangre	10
1.2 Ácidos grasos de membrana.....	11
1.3 Función de los ácidos grasos en las membranas	13
1.3.1 Fluidéz de membrana	13
1.3.2 Enzimas unidas a membranas.....	14
1.3.3 Efectos en los receptores de membrana.....	14
1.3.4 Fusión de membrana	14
1.4 Factores que afectan al metabolismo de los ácidos grasos en ganado bovino ..	15
1.4.1 Aumento de la temperatura ambiental	15
1.4.2 Momento de lactación y gestación	16
1.4.3 Tratamientos veterinarios.....	16
1.4.4 Dieta del ganado bovino	17
1.5 Ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos	17
1.6 Ácidos grasos de las membranas de los leucocitos.....	18

2. Objetivos.....	20
3. Material y métodos.....	21
3.1 Estudio animal y recolección de muestras.....	21
3.2 Aislamiento de glóbulos rojos y blancos	22
3.3 Extracción de ácidos grasos de membrana	23
3.4 Determinación de ácidos grasos mediante GC-FID.....	24
3.5 Análisis estadístico	25
4. Resultados y discusión	26
4.1 Composición de ácidos grasos de la membrana de las células sanguíneas bovinas	27
4.1.1 Eritrocitos.....	27
4.1.2 Linfocitos	31
4.2 Evolución temporal de los ácidos grasos de membrana de células sanguíneas bovinas.....	33
4.2.1 Eritrocitos.....	33
4.2.2 Linfocitos	38
4.2.3 Comparación entre eritrocitos y linfocitos.....	43
4.3 Influencia del tratamiento con rbST en los ácidos grasos de membrana de células sanguíneas bovinas	44
5. Conclusión.....	49
6. Bibliografía.....	50

Índice de figuras

Figura 1: Diferencias entre las células sanguíneas analizadas. Elaborado con biorender.com.....	11
Figura 2: Membrana plasmática formada por lípidos y proteínas. Elaborado con biorender.com.....	11
Figura 3: Clasificación de los ácidos grasos. Elaborado con biorender.com a partir de (Tvrzicka et al., 2011)	12
Figura 4: a) Gráfico de puntuación del PCA realizado con la abundancia relativa de los grasos de la membrana de eritrocitos bovinos (1=control; 2=tratadas con rbST). b) Gráfico de cargas de cada componente graso para la distribución del PCA en eritrocitos.	27
Figura 5: a) Gráfico de puntuación del PCA realizado con la abundancia relativa de los grasos de la membrana de eritrocitos bovinos (1=control; 2=tratadas con rbST). b) Gráfico de cargas de cada componente graso para la distribución del PCA en eritrocitos.	31
Figura 6: Evolución ácidos grasos saturados (a), poliinsaturados (b) y ω -6 (c) en la membrana de los eritrocitos en ganado bovino de leche.	33
Figura 7: Evolución ácidos grasos monoinsaturados en la membrana de los eritrocitos en ganado bovino de leche.	36
Figura 8: Evolución ácidos grasos ω -3 en la membrana de los eritrocitos en ganado bovino de leche.....	37
Figura 9: Evolución ácidos grasos CLAs en la membrana de los eritrocitos en ganado bovino de leche.....	37
Figura 10: Evolución ácidos grasos saturados en la membrana de los linfocitos del ganado bovino de leche.....	39
Figura 11: Evolución ácidos grasos monoinsaturados en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche.	39
Figura 12: Evolución ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche.....	40

Figura 13: Evolución ácidos grasos ω -3 en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche..... 41

Figura 14: Evolución ácidos grasos ω -6 en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche..... 41

Figura 15: Evolución ácidos grasos CLAs en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche..... 42

Figura 16: Comparación de la evolución de los diferentes ácidos grasos en las membranas plasmáticas de eritrocitos y linfocitos en ganado bovino de leche. 43

Figura 17: Comparación del porcentaje de los distintos ácidos grasos en la membrana de los eritrocitos entre las vacas control y las tratadas con somatotropina recombinante. 46

Figura 18: Comparación del porcentaje de los distintos ácidos grasos en la membrana de los linfocitos entre las vacas control y las tratadas con somatotropina recombinante. 47

Índice de tablas

Tabla 1: Composición alimentaria analítica del ganado bovino objeto de estudio (datos cedidos por la explotación).	21
Tabla 2: Temperatura registrada durante los días del estudio. Información obtenida de la AEMET.	22
Tabla 3: Valores medios de cada grupo de ácidos grasos en la membrana de las células sanguíneas obtenidas de vacas lactantes.....	26
Tabla 4: Comparación de valores medios de los ácidos grasos en la membrana de los RBCs y de los valores de los ácidos grasos de los RCB del control externo diferenciado.	30
Tabla 5: Comparación valores medios entre linfocitos y eritrocitos del ganado bovino de leche y significación de sus diferencias.....	44
Tabla 6: Comparación valores medios ácidos grasos de los eritrocitos de las vacas control y de las vacas tratadas con Lactotropina y significación de sus diferencias. ...	46
Tabla 7: Comparación valores medios ácidos grasos de linfocitos de las vacas control y de las vacas tratadas y significación de sus diferencias.....	48

Abreviaturas

- AA: Ácido araquidónico.
- ACAT: Acil-CoA Colesterol Acil-Transferasa.
- AEMET: Agencia Estatal de Meteorología.
- ANOVA: Análisis de la Varianza.
- CLA: Ácido linoleico conjugado.
- DHA: Ácido docosahexaenoico.
- FAME: Éster Metílico de los Ácidos Grasos.
- FID: Detector de Ionización de Llama.
- GC: Cromatografía de Gases.
- MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- MUFA: Ácido graso monoinsaturado.
- NK: Células *natural killer*.
- PBS.
- PCA: Análisis de Componentes Principales.
- PEG: Polietilenglicol.
- PUFA: Ácido graso poliinsaturado.
- RBC: Glóbulos rojos o eritrocitos (*red blood cells*).
- rbST: Somatotropina bovina recombinante.
- SFA: Ácido graso saturado.
- WBC: Glóbulos blancos o leucocitos (*white blood cells*).

Resumen

Caracterización longitudinal de la composición de membrana de las células sanguíneas del ganado bovino.

La sangre es un tipo especializado de tejido conectivo compuesto de elementos celulares y una matriz líquida denominada plasma. Estos componentes celulares sanguíneos están expuestos a los cambios metabólicos que se producen en el plasma y en el cuerpo. En cuanto a su abundancia en la sangre, los eritrocitos constituyen el mayor volumen, seguidos de una fracción mucho menor de leucocitos y plaquetas. Su interacción con el medio externo está mediada por una membrana plasmática de contenido particular, en el que destacan los ácidos grasos como componentes indicadores del estado de salud de estos elementos y del organismo por el que circulan. La composición de la membrana es dependiente del medio, que depende de múltiples factores tanto endógenos como exógenos. En este trabajo experimental se analiza la composición de ácidos grasos de la membrana de dos componentes celulares sanguíneos, los eritrocitos y los leucocitos, en ganado bovino lechero en régimen intensivo. Se utiliza un equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización en llama (GC-FID). El objetivo es realizar la caracterización longitudinal de los ácidos grasos de membrana de eritrocitos y leucocitos bovinos, a fin de comprender su naturaleza y variabilidad. Se ha observado que los principales factores que producen cambios en la membrana de los eritrocitos son la temperatura ambiental y el estado de gestación del animal. Así mismo, se puede concluir que tanto los perfiles como el patrón de cambio longitudinal de los ácidos grasos en las membranas son distintos entre los dos tipos de células sanguíneas, debido posiblemente a las diferencias en su vida media y en su función celular. Por último, se ha observado que los tratamientos veterinarios potenciadores de la producción láctea basados en somatotropina recombinante no influyen significativamente en la composición de membrana, a pesar de tener un impacto demostrado en el metabolismo lipídico del animal.

Palabras clave: bovino, célula sanguínea, eritrocito, leucocito, evolución, tiempo, ácidos grasos, membrana.

Resumo

Caracterización lonxitudinal da composición de membrana das células sanguíneas do gando bovino.

O sangue é un tipo especializado de tecido conectivo composto de elementos celulares e una matriz líquida denominada plasma. Estes compoñentes celulares sanguíneos están expostos aos cambios metabólicos que se producen no plasma e no corpo. En canto á súa abundancia no sangue, os eritrocitos constitúen o maior volume, seguidos dunha fracción moito menor de leucocitos e plaquetas. A súa interacción co medio externo está mediada por una membrana plasmática de contido particular, no que destacan os ácidos graxos como compoñentes indicadores do estado de saúde destes elementos e do organismo polo que circulan. A composición da membrana é dependente do medio, que depende á súa vez de múltiples factores tanto endóxeos como esóxeos. Neste traballo experimental analízase a composición de ácidos graxos da membrana de dous compoñentes celulares sanguíneos, os glóbulos vermellos e brancos, en gando bovino leiteiro en réxime intensivo. Utilízase un equipo de cromatografía de gases combinado cun detector de ionización en chama (GC-FID). O obxectivo é realizar a caracterización lonxitudinal dos ácidos graxos de membrana de eritrocitos e leucocitos bovinos, co fin de comprender a súa natureza e variabilidade. Observouse que os principais factores que producen cambios na membrana dos eritrocitos son a temperatura ambiental e o estado de xestación do animal. Así mesmo, pódese concluír que tanto os perfís como o patrón de cambio lonxitudinal dos ácidos graxos nas membranas é distinto entre os dous tipos de células sanguíneas, debido posiblemente ás diferenzas na súa vida media e na súa función celular. Por último, observouse que os tratamentos veterinarios promotores da produción láctea baseados en somatotropina recombinante, non inflúen significativamente na composición de membrana, a pesar de ter un impacto demostrado no metabolismo lipídico do animal.

Palabras clave: bovino, célula sanguínea, eritrocito, leucocito, evolución, tempo, ácidos graxos, membrana.

Abstract

Longitudinal characterization of the membrane composition of cattle blood cells.

Blood is a specialized type of connective tissue made up of cellular elements and a liquid matrix called plasma. These cellular blood components are exposed to the metabolic changes that occur in the plasma and in the body. In terms of their abundance in the blood, erythrocytes constitute the largest volume, followed by a much smaller fraction of leukocytes and platelets. Their interaction with the external environment is mediated by a plasma membrane with a particular content, in which fatty acids stand out as components that indicate the state of health of these elements and the organism through which they circulate. The composition of the membrane is dependent on the environment, which in turn depends on multiple factors, both endogenous and exogenous. In this experimental work, the composition of fatty acids of the membrane of two blood cell components, erythrocytes and leukocytes, in dairy cattle in intensive regime, is analysed. A gas chromatography equipment coupled to a flame ionization detector (GC-FID) is used. The objective is to perform the longitudinal characterization of the membrane fatty acids of bovine erythrocytes and leukocytes, to understand their nature and variability. It has been observed that the main factors that produce changes in the erythrocyte's membrane are environmental temperature and gestation stage of the animal. Likewise, it can be concluded that profiles and pattern of change of fatty acids in membranes are different between the two types of blood cells, possibly due to differences in their half-life and cell function. Finally, it has been observed that veterinary treatments that enhance milk production based on recombinant somatotropin do not significantly influence membrane composition despite having an impact on the lipid metabolism of the animal.

Keywords: bovine, blood cell, erythrocyte, leukocyte, evolution, time, fatty acids, membrane.

1. Introducción

1.1 Componentes celulares de la sangre

La sangre es un tejido conectivo especializado formado principalmente por el plasma y los elementos celulares. El plasma es la matriz líquida en la que se encuentran suspendidos los elementos celulares de la sangre. Está formado por agua, iones, moléculas orgánicas (proteínas, aminoácidos, glucosa, lípidos entre otras), oligoelementos y vitaminas y por gases como el oxígeno o el dióxido de carbono. Los elementos celulares pueden ser de tres tipos: glóbulos rojos, eritrocitos o hematíes (*red blood cells*, RBC), glóbulos blancos o leucocitos (*white blood cells*, WBC), y plaquetas. Los glóbulos rojos conforman el 42 % del volumen total sanguíneo, mientras que los glóbulos blancos tienen un volumen menor al 1 % en sangre (Silverthorn, 2019c).

Los glóbulos rojos (RBC) o eritrocitos son células que tienen una vida media de 120 días y que no poseen un núcleo en su estructura, ya que lo pierden al entrar al torrente sanguíneo. La función de estas células es transportar oxígeno a través del torrente sanguíneo hasta los distintos órganos, donde recogen el CO₂ y lo llevan a los pulmones para expulsarlo así del organismo en forma de desecho (Silverthorn, 2019c). Por su parte, los glóbulos blancos o leucocitos, a diferencia de los hematíes, poseen núcleo y su principal función es participar y llevar a cabo las respuestas inmunitarias del cuerpo. Se pueden encontrar hasta cinco tipos de leucocitos diferentes en sangre, que son: los linfocitos, los monocitos, los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos. Algunos de estos tipos celulares pueden abandonar el torrente sanguíneo y diferenciarse en otros tipos celulares, como por ejemplo los monocitos, que cuando abandonan la circulación, forman macrófagos (Silverthorn, 2019a). Los linfocitos, cuya vida media es de 18 días, se encargan de la respuesta inmunitaria adaptativa, y la mayoría de ellos se encuentran en los tejidos linfáticos, pero en sangre, representan entre un 20 y un 35 % de los glóbulos blancos totales (Silverthorn, 2019a).

Los linfocitos son células que reconocen y responden a antígenos extraños en nuestro organismo. Se pueden encontrar circulando en la sangre y la linfa o en los órganos linfáticos. Existen tres tipos de linfocitos: los linfocitos B, los linfocitos T y las células asesinas o *Natural Killer* (NK). Los linfocitos T reconocen antígenos presentados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), dependiendo del tipo de linfocito T, reconocerán los péptidos presentados por el MHC I o por el MHC II. Por otro lado, los linfocitos B se encargan de producir los anticuerpos compatibles con el antígeno extraño

que no reconoce nuestro cuerpo. Por último, las células NK son capaces de eliminar las células cancerosas o las células que están infectadas (Calder et al., 1994).

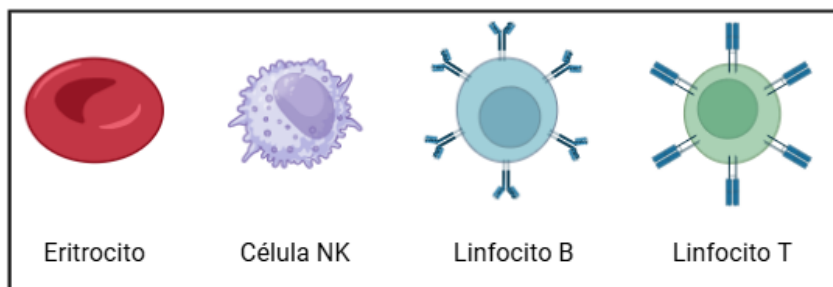


Figura 1: Diferencias entre las células sanguíneas analizadas. Elaborado con biorender.com.

1.2 Ácidos grasos de membrana

Las membranas celulares están formadas por una bicapa lipídica en la que encontramos embebidas proteínas. La composición porcentual de la membrana en cuanto a proteínas y lípidos depende de la actividad de la célula de la que forme parte. Cuanta más actividad metabólica posea, mayor será su contenido proteico (Silverthorn, 2019b).

Las membranas celulares forman una barrera que delimita físicamente a la célula, pero que, a su vez, le permiten comunicarse con el medio que le rodea a través de receptores de membrana y otros procesos comunicativos como la endocitosis, pinocitosis o exocitosis. La composición lipídica de la membrana plasmática es un factor clave para crear y mantener el ambiente adecuado en el que las proteínas de membrana, los sustratos de las enzimas, los segundos mensajeros que se generan al recibir un estímulo y las moléculas producidas por la propia célula puedan desarrollar su función correctamente (Poggi et al., 2015).

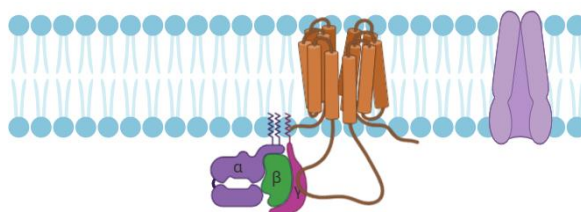


Figura 2: Membrana plasmática formada por lípidos y proteínas. Elaborado con biorender.com.

En la mayoría de las células, los lípidos son los componentes principales de sus membranas, especialmente los fosfolípidos, los esfingolípidos y el colesterol. Los fosfolípidos están formados por una molécula de glicerol a la que se unen, a través de enlaces éter, dos ácidos grasos y una molécula de fosfato, formando así una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba. Los esfingolípidos (presentes en menor cantidad en las membranas celulares) también tienen en su estructura una cola hidrofóbica formada por

dos ácidos grasos, sin embargo, su cabeza polar puede estar formada por fosfocolina o glúcidos. El tercer componente lipídico de las membranas celulares es el colesterol, que se inserta entre las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos e impermeabiliza las membranas a moléculas pequeñas e hidrosolubles. Además, mantiene las membranas flexibles en un amplio rango de temperatura (Silverthorn, 2019b).

Tanto los fosfolípidos como los esfingolípidos son la unidad fundamental de las membranas celulares, y están compuestos de ácidos grasos que varían en función de la edad, la alimentación y muchos otros factores. Por tanto, se puede decir que los ácidos grasos son los componentes principales de las membranas celulares (Poggi et al., 2015).

Los ácidos grasos se clasifican principalmente en dos grupos, según la presencia o no de dobles enlaces en su estructura hidrocarbonada: los ácidos grasos saturados y los ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos saturados se caracterizan por no poseer en su estructura ningún doble enlace (o insaturación), por otro lado, los ácidos grasos insaturados se caracterizan por poseer uno o más dobles enlaces. A su vez, estos últimos, se dividen en ácidos grasos monoinsaturados y en ácidos grasos poliinsaturados, con una o más de una insaturación, respectivamente. Dentro de los ácidos grasos monoinsaturados se encuentran los palmitoleicos (n-7) y los oleicos (n-9). Y dentro de los poliinsaturados hay dos tipos de ácidos grasos: los linoleicos (n-6) y los linolénicos (n-3). Los palmitoleicos y oleicos son ácidos grasos no esenciales, es decir, se sintetizan *de novo* en las células. Sin embargo, los ácidos linoleico y α -linoleico son ácidos grasos esenciales, que actúan como precursores para sintetizar el resto de ácidos grasos pertenecientes a los grupos n-6 y n-3 (Tvrzicka et al., 2011).

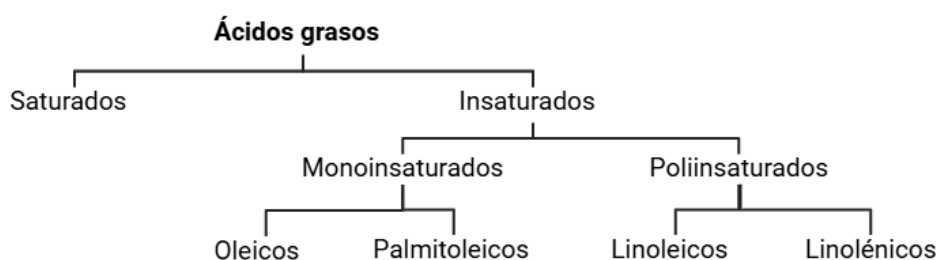


Figura 3: Clasificación de los ácidos grasos. Elaborado con biorender.com a partir de (Tvrzicka et al., 2011)

Los ácidos grasos de membrana suelen tener entre 14 y 24 carbonos de longitud, y pueden tener desde ninguna, hasta seis insaturaciones. Las características estructurales (longitud e insaturaciones) de los ácidos grasos de las membranas plasmáticas influyen en las propiedades físicas y funcionales de la membrana (Poggi et

al., 2015). El tipo de ácidos grasos (monoinsaturados, poliinsaturados, saturados, etc.) que está presente en las membranas, aparte de condicionar la estructura general de la membrana, también influye en su función, puesto que las propiedades biofísicas de la membrana son diferentes dependiendo de los ácidos grasos que la compongan (Matorras et al., 1998). De esta forma, la composición de los ácidos grasos de la membrana también afectará a procesos de tráfico molecular, a la unión de proteínas a dicha membrana y a su funcionalidad, y a muchos otros procesos importantísimos para el correcto funcionamiento de la célula.

1.3 Función de los ácidos grasos en las membranas

1.3.1 Fluidéz de membrana

La principal característica física que aportan los distintos ácidos grasos a las membranas celulares es la fluidez o la rigidez. Las membranas plasmáticas son fluidas, y dicha fluidez depende principalmente de dos factores: de su composición lipídica y de la temperatura en la que se encuentren. Dependiendo de estas dos características, las membranas se van a encontrar en dos estados distintos: en estado de gel o en estados de cristal líquido. El estado de gel se produce cuando los ácidos grasos están más rígidos, adquiriendo un estado más sólido, mientras que, en el estado de cristal líquido, la membrana va a ser más fluida como consecuencia de que los ácidos grasos tengan más movilidad. La temperatura a la que se produce el cambio del estado de gel al de cristal líquido se denomina temperatura de transición de fase. Los lípidos de la membrana determinan la temperatura de transición de fase, de forma que los lípidos con insaturaciones *cis* y los de cadena corta, hacen que esta temperatura disminuya, consiguiendo así que la membrana sea más fluida (Vance & Vance, 1996).

La cantidad de ácidos grasos saturados que encontramos en las membranas de las células sanguíneas depende, en gran medida, de los ácidos grasos circulantes en sangre, de forma que, cuanto mayor sea la concentración de ácidos grasos saturados circulantes en el plasma, más rígidas serán las membranas de las células sanguíneas (Weijers, 2015). Los ácidos grasos insaturados se caracterizan por aportar fluidez a las membranas celulares, y, la pérdida o la ausencia de la cantidad necesaria de dichas moléculas, podría ser fatal para las células, haciendo que su membrana fuese demasiado rígida y pudiendo alterar así la conformación y funcionalidad, no solo de la célula en general, sino también de los distintos tipos de proteínas que están presentes en su membrana (Aktas et al., 2016).

1.3.2 Enzimas unidas a membranas

Los cambios que se producen en las membranas plasmáticas pueden afectar a las enzimas que se encuentran unidas a ellas y a su funcionalidad. Algunos ejemplos en los que se ha observado un cambio de comportamiento en las enzimas de membrana causado por la variación de la composición lipídica son: la adenilato ciclasa, que cuando la membrana no posee los ácidos grasos insaturados esenciales mínimos, su actividad se puede ver aumentada; la ACAT (acil-CoA colesterol acil-transferasa), cuya actividad varía (aumentando o disminuyendo) dependiendo del tipo celular en el que se encuentre; o la Na/K-ATPasa, que el aumento de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana puede modificar su temperatura de transición y su energía de activación (De Carvalho et al., 2018).

Todas las enzimas de membrana deben mantener su actividad, puesto que muchas de ellas tienen funciones de segundos mensajeros, y, si su actividad se ve alterada, puede cambiar el comportamiento celular, por lo que es de suma importancia mantener las características de la membrana celular.

1.3.3 Efectos en los receptores de membrana

Al igual que con el caso de las enzimas, los receptores de membrana también se pueden ver afectados por la composición lipídica de la membrana, incrementando o disminuyendo la afinidad de unión entre el ligando y el receptor, e incluso, en algunos casos, la composición grasa de la membrana también interviene en el número de receptores presentes en la membrana, aunque depende mucho del tipo celular y el receptor (De Carvalho et al., 2018).

1.3.4 Fusión de membrana

Con el término fusión de membrana se habla de la capacidad de la membrana para formar e incorporar vesículas, por tanto, se engloban procesos como la fagocitosis, la endocitosis o la exocitosis. La fusión de membrana está directamente relacionada con la fluidez: cuanto más fluida es una membrana, más aumenta su capacidad para formar vesículas, incorporarlas a la membrana o fagocitar moléculas. En el caso de que la membrana experimente un aumento en la concentración de ácidos grasos saturados, esta capacidad de fusión de membrana se verá reducida (Mishra et al., 2023), y, por tanto, la capacidad comunicativa y de incorporación de moléculas, también será menor.

La posibilidad de analizar los ácidos grasos de la membrana celular de las células sanguíneas, como los eritrocitos y linfocitos, en lugar de los que están libres en el plasma, es que aportan una información más estable sobre los cambios metabólicos que se han producido en el individuo, y que se producen bajo unas condiciones concretas, como un cambio de dieta o de tratamiento con algún fármaco (Ferrerri et al., 2016).

1.4 Factores que afectan al metabolismo de los ácidos grasos en ganado bovino

Debida a la importancia del ganado bovino en la alimentación humana, es importante estudiar la evolución longitudinal de sus células sanguíneas para conocer los factores que provocan cambios en ellas y así estudiar el estado de salud del animal.

Existe una serie de factores que afecta al metabolismo de los ácidos grasos del ganado bovino y que por tanto cambia su concentración en sangre. Estos factores son: los genes, la edad, el género, el estado de salud, los cambios epigenéticos y su interacción con los genes y la interacción entre los distintos genes (Lankinen et al., 2018). Además de todos estos factores, también encontramos algunos ambientales como el calor estacional o aumento de temperatura (Joo et al., 2021), el momento de lactación (Veshkini et al., 2023) y el estado de gestación en el que se encuentre el animal (Ghebremeskel et al., 2000), la dieta que sigue el animal (Revskij, et al., 2019) y, posiblemente, el efecto de tratamientos veterinarios exógenos.

1.4.1 Aumento de la temperatura ambiental

Los aumentos de temperatura pueden causar estrés al ganado produciendo así una disminución de la ingesta diaria de comida. Esto afecta también a la producción láctea del ganado bovino, la cual se verá disminuida en cantidades claramente apreciables (Joo et al., 2021). Al reducir su ingesta alimentaria, las vacas pueden llegar a experimentar un balance energético negativo, ya que no ingieren la cantidad de comida suficiente como para cubrir su producción láctica, lo que supone una movilización de grasas de las reservas corporales. Los adipocitos liberan su contenido haciendo que aumenten los ácidos grasos no esterificados en sangre. La mayoría de estos ácidos grasos liberados son ácidos grasos saturados. Al aumentar su concentración en plasma, las células sanguíneas captan más ácidos grasos saturados en sus membranas que en épocas más frescas (Joo et al., 2021).

1.4.2 Momento de lactación y gestación

Durante el período de lactación ocurre una situación parecida a la que se produce con el aumento de temperatura ambiental en la que el animal también experimenta un balance energético negativo en la primera fase de la producción (Veshkini et al., 2023). Tras el parto, las vacas experimentan una movilización de las reservas energéticas, haciendo que se pierda una parte importante de su masa grasa. Esta movilización grasa produce la liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo, de donde las células sanguíneas van a captar los ácidos grasos para incorporarlos a su composición. A partir de la semana 14, las reservas grasas comienzan a recuperarse muy lentamente hasta que en torno a la semana 40 después del parto, recuperan los valores previos al parto (Nielsen et al., 2003).

El momento de gestación también influye en la composición de la membrana de las células sanguíneas de la línea roja (RBC), ya que el feto necesita incorporar mayoritariamente ácido araquidónico (AA) y ácido docosahexaenoico (DHA), por lo que la concentración de ácidos grasos ω -3 y ω -6 en las membranas se ven afectados por la gestación (Ghebremeskel et al., 2000).

1.4.3 Tratamientos veterinarios

Otro factor a tener en cuenta respecto a la movilización de grasas en el ganado lechero es el uso de fármacos veterinarios, como por ejemplo la somatotropina recombinante o Lactotropina (rbST), un fármaco veterinario que administran algunos productores de leche a sus animales y que tiene la misma función que la hormona del crecimiento o somatotropina natural. Esta hormona regula muchos procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento, el metabolismo y la reproducción (Robert et al., 2017). En este sentido, se ha demostrado que en las vacas produce un aumento en la producción láctea debido a su parecido estructural con la prolactina (hormona encargada de la síntesis de leche en mamíferos), de manera que es capaz de unirse a su receptor produciendo el mismo efecto fisiológico (Chilton & Hewetson, 2005).

Existen otros tratamientos veterinarios que mejoran el rendimiento animal en la producción lechera, como los antibióticos, que se administran al ganado cuando sufre mastitis, la enfermedad más común en el ganado bovino. Con la administración de los antibióticos se consigue una reacción de inflamación menos pronunciada y una mayor producción láctea sin que la composición lipídica de la leche se vea afectada. Las principales especies de bacterias asociadas a la mastitis que pueden causar

alteraciones en la composición lipídica de la leche son: *Bifidobacterium*, *Ureaplasma*, *Atopococcus*, *Mycoplasma*, *Psychrobacter*, *Ruminobacter* y *Trepome*, que cambian la composición láctea mediante la alteración del metabolismo del ácido araquidónico, del ácido α -linolénico y de los glicerofosfolípidos (Luo et al., 2023).

1.4.4 Dieta del ganado bovino

La dieta del ganado influye en el perfil lipídico de las membranas plasmáticas de los eritrocitos de los animales. Se ha demostrado que en función de la dieta que sigan, la ratio de ácidos grasos ω -6/ ω -3 de las vacas se ve afectado. La variación de esta ratio influye sobre la liberación de ATP de este tipo celular, haciendo que se reduzca (Revskij, et al., 2019).

1.5 Ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos

Debido a su función en el cuerpo, los eritrocitos deben reunir unas características únicas, y, como es lógico, su membrana también debe reunir las: debe ser una membrana muy elástica, capaz de responder a las tensiones aplicadas de fluidos y poseer una inmensa resistencia estructural. Por otro lado, un glóbulo rojo debe ser capaz de deformarse hasta un 250 %, pero siempre sin modificar su superficie de membrana, ya que una pequeña modificación de su superficie (de entre un 3 o un 4 %) conduce a la lisis celular. Llevar a cabo estas deformaciones es posible gracias a la asociación entre una red elástica bidimensional de proteínas esqueléticas unidas a proteínas ancladas en la membrana plasmática o a fosfolípidos aniónicos (aunque estas últimas uniones son menos frecuentes) (Mohandas & Gallagher, 2008).

En el caso de los hematíes, la bicapa lipídica está formada en la misma proporción por colesterol y fosfolípidos. El colesterol se distribuye en ambas caras de la bicapa en proporciones similares, sin embargo, los fosfolípidos se disponen de forma asimétrica (Mohandas & Gallagher, 2008).

Por otro lado, en este tipo de células, la fluidez es una característica clave, ya que afecta a la agregación de los glóbulos rojos y al comportamiento físico, en general, de las células, de manera que, si hay algún problema en las membranas celulares de los eritrocitos, podrían darse problemas anémicos por agregación de los glóbulos rojos (Ferlazzo et al., 2011).

Los eritrocitos son células que tienen una vida media de 120 días (Nguyen et al., 2023) y reponen sus lípidos de membrana gracias a los ácidos grasos libres que encuentran

en plasma. Por tanto, en función de los ácidos grasos presentes en sangre de manera prolongada en el tiempo, los eritrocitos captarán dichos ácidos grasos para formar parte de sus membranas. Así, se puede saber la proporción estable de ácidos grasos que circulan en sangre. Además, se debe tener en cuenta que los RBC son células circulantes, y, por esta razón están en contacto con todos los tejidos corporales, lo que les confiere la capacidad de adquirir los ácidos grasos de membrana de otros tejidos además de los presentes en la sangre.

La composición grasa de la membrana de los eritrocitos varía entre unas especies y otras. Se pueden observar cambios en la composición dependiendo del animal que se analice (Plasenzotti et al., 2007).

1.6 Ácidos grasos de las membranas de los leucocitos

El motivo por el que en este trabajo se analizan los linfocitos y no los leucocitos en general, es que los linfocitos son unos glóbulos blancos muy abundantes en sangre bovina (1,700-5,600 células/ μ L) (Orakpoghenor et al., 2019), como la obtención de los leucocitos en general, es bastante compleja, el estudio se desarrolla sobre las células más abundantes: los linfocitos.

Los ácidos grasos de membrana de los linfocitos afectan a sus características, esta vez no solo a la fluidez de su membrana, sino que también intervienen en otros procesos importantísimos como la adherencia del linfocito a los tejidos o a su migración (Pompéia et al., 2000).

Los linfocitos, cuando maduran, aumentan considerablemente su tamaño, por tanto, necesitan aumentar superficie de membrana incorporando ácidos grasos en ellas, que, obviamente afectan a su estructura y a su función. En estudios *in vitro* se observó que cambiaba la adherencia de los linfocitos al endotelio dependiendo de en qué características se incubaban los linfocitos, es decir, si estaban rodeados de unos ácidos grasos u otros, puesto que cambiaba su membrana plasmática. Es cierto, que, incubados *in vitro*, los linfocitos siguen patrones de incorporación de ácidos grasos a su membrana que no siguen *in vivo*, puesto que, si incubamos linfocitos en un medio enriquecido con ácido α -linolénico, su proporción en la membrana alcanzará el 12 %, mientras que *in vivo*, su proporción en la membrana de los linfocitos no supera el 3 % (Calder et al., 1994).

La migración a los linfocitos desde la sangre a los órganos linfáticos, y viceversa, puede deberse a varias causas, como las condiciones hemodinámicas y físicas del cuerpo o el

estado bioquímico de las células. Sin embargo, las alteraciones de las membranas celulares cambian el patrón normal de migración de los linfocitos debido a su influencia sobre la deformabilidad de las células (muy relacionada con la fluidez), la adhesión celular, y, en general la composición lipídica, que puede intervenir en la actividad enzimática de las células (Pompéia et al., 2000).

La adherencia de los linfocitos a los tejidos es un paso crucial para el correcto desarrollo de la función de estas células, la cual está directamente relacionada con la fluidez de la membrana, ya que, para unirse a los tejidos, son necesarios unos receptores que están embebidos en la membrana plasmática de los linfocitos. Cuanto más fluida es una membrana, más fácilmente se adhieren los linfocitos a los tejidos, porque más fácilmente se insertan los receptores en la membrana celular (Twisk et al., 1991). Sin embargo, en su trabajo, Novo et al., (1987) vieron que no había una relación lineal entre el aumento de la concentración de ácidos grasos insaturados y el aumento de la adherencia de los linfocitos, sino que la adherencia dependía más de las propiedades específicas de los ácidos grasos poliinsaturados que se encontraban en la membrana.

Los linfocitos desempeñan la importante función de la presentación de antígenos, y su función se ve afectada por los ácidos grasos que componen su membrana. Se ha demostrado que los ácidos grasos saturados no influyen de manera directa en la función inmunitaria, sin embargo, los PUFA sí que intervienen en diferentes procesos de producción de interleucinas (IL-2) y en algunas funciones de las células NK, mejorando así la respuesta inmunitaria. Para conseguir la mejora inmunitaria, las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados deben mantenerse elevadas en el tiempo, y, a través de una dieta normal, es difícil adquirirlas (Calder et al., 2002).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo experimental es realizar una caracterización longitudinal de la membrana de las células sanguíneas del ganado bovino de leche, en particular, valorando la composición de los glóbulos rojos (RBC) y los glóbulos blancos (WBC) en cuanto a su contenido en ácidos grasos de membrana.

Para alcanzar este objetivo, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Analizar los perfiles de ácidos grasos de membrana de RBC y WBC en hembras bovinas en lactación mediante GC-FID.
- Determinar la evolución longitudinal de los ácidos grasos de membrana de RBC y WBC en hembras bovinas en lactación, en régimen intensivo.
- Determinar el impacto de factores exógenos (temperatura, tratamientos veterinarios) en la composición de los ácidos grasos de membrana de RBC y WBC en hembras bovinas en lactación.

3. Material y métodos

3.1 Estudio animal y recolección de muestras

Este estudio incluyó nueve vacas de raza Holstein de primera o segunda lactación seleccionadas de una granja de producción lechera de la provincia de Lugo en régimen intensivo, con edades comprendidas entre 1,5 y 4 años. Estos animales se alojaron separados del resto del ganado bovino de la granja, con acceso al agua *ad libitum*, y dos veces al día recibieron una ración optimizada para vacas lecheras. La ración de comida contenía: alfalfa, maíz, cáscara de soja, harina de extracción de simiente de colza, cebada, paja de cereal, melaza, trigo, sales cálcicas de ácidos grasos palma, harina de extracción de soja tostada, carbonato cálcico, bicarbonato de sodio, cloruro sódico y óxido de magnesio. Los componentes analíticos se muestran en la Tabla 1 representada a continuación:

Tabla 1: Composición alimentaria analítica del ganado bovino objeto de estudio (datos cedidos por la explotación).

Componente analítico	Cantidad (%)
Proteína bruta	14.5
Celulosa bruta	13.6
Cenizas	7.3
Grasa bruta	3.9
Sodio	0.4

Para obtener las muestras de sangre de los animales, se utilizaron sets de recolección de sangre Vacuette® con adaptador Luer. La sangre se recogió en tubos con EDTA en los días 1, 7, 50, 95 y 214 de este estudio, considerándose el inicio del seguimiento de los animales como tiempo 0. A tiempo 0 las vacas seleccionadas llevaban lactando 75 ± 15 días.

La temperatura registrada durante los días de estudio de la muestra según la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) se recoge en la Tabla 2 que se muestra a continuación.

Tabla 2: Temperatura registrada durante los días del estudio. Información obtenida de la AEMET.

Día de estudio	Temperatura registrada (máxima/mínima) (°C)
1	19.4°/11.4°
7	16.1°/8.6°
50	24.4°/12.7°
95	20.9°C/9.2°C
214	12.9°/4.3°

De las nueve vacas seleccionadas, tres de ellas no se sometieron a ningún tipo de tratamiento veterinario, es decir, se utilizaron como vacas control en cuanto a este factor, mientras que las otras seis vacas restantes se trataron con 500 mg de rbST (Lactotropina, Elanco, Eli Lilly, México) cada 14 días para aumentar su producción lechera. El primer día de tratamiento con Lactotropina fue a tiempo 0, coincidiendo con 10 semanas de lactación (75 ± 15 días) tal y como indica el fabricante. Se administraron un total de 12 dosis de Lactotropina a cada vaca tratada, cubriendo así, prácticamente, todo el período de lactación, con un intervalo de 168 días entre la primera y la última dosis. Entre la quinta y la sexta dosis, hubo un período de descanso de 28 días sin tratamiento (en vez de 14 días) para comprobar si la producción de leche disminuía debido a la retirada del medicamento.

Todos los procedimientos con los animales se realizaron de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos, y su transposición a la legislación nacional. En particular, todos los procedimientos se realizaron respetando el bienestar animal y sin causar más dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que el equivalente al causado por la introducción de una aguja, de acuerdo con la buena práctica veterinaria. Los animales fueron supervisados en todo momento por personal veterinario, quienes se encargaron de recoger las muestras de sangre.

3.2 Aislamiento de glóbulos rojos y blancos

Los glóbulos blancos y los glóbulos rojos se aislaron y recolectaron en cinco puntos temporales diferentes del estudio. Se recogieron por igual datos de las membranas de las células sanguíneas de las vacas tratadas, y de las vacas control en los días 1, 7, 50, 95 y 214. Por último, también se tomaron datos de los componentes grasos de las

membranas de las células sanguíneas de dos vacas (10 y 11) de la misma granja el día 98, que actuarían como animales de control para validación de los resultados obtenidos.

Para separar las células sanguíneas se aplicó un protocolo de fraccionamiento basado en la centrifugación de la sangre recogida en tubos con EDTA. Se utilizó una adaptación del protocolo descrito por Chamorro López et al. (2013).

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. Con esto, se dividen por capas las distintas fracciones sanguíneas. En la parte superior queda el plasma sanguíneo, como un líquido transparentoso o, ligeramente amarillento, ya que quien aporta el color a la sangre son los glóbulos rojos. La segunda capa que se puede apreciar son los glóbulos blancos o linfocitos, siendo esta una capa muy fina de color blanco y de apariencia viscosa. Por último, en la capa inferior se recogen los glóbulos rojos, mucho más abundantes que los linfocitos por lo que crean una capa mucho más gruesa.

Tras el fraccionamiento de la sangre, se procede a la separación de los distintos componentes con una pipeta Pasteur de plástico de 2 mL. El primer paso es la retirada del plasma sanguíneo, y a continuación se separan los glóbulos blancos de los eritrocitos para depositarlos en un microtubo Eppendorf de 1.5 mL. Una vez transferidos los linfocitos al microtubo, se añade 1 mL de PBS (pH 7,4, sin ARNasa de la línea de productos Ambion™, ThermoFisher Scientific) para su lavado y eliminación de posibles restos de glóbulos rojos que hayan sido arrastrados en el paso anterior (Barreiro et al. 2020).

Tras añadir el PBS, se agita y centrifuga el tubo, y con pipeta Pasteur se separan de nuevo los glóbulos blancos de los glóbulos rojos que pueda haber presentes y se transfieren a un microtubo limpio. Cuando ya solo quedan glóbulos blancos en la disolución, la fracción se redisuelve en 200 µL de PBS y se congela a -20°C hasta su análisis. Por último, se recolecta 1mL de la capa de eritrocitos, se mezcla con 2 mL de PBS y se conserva también a -20 °C (Barreiro et al. 2020).

3.3 Extracción de ácidos grasos de membrana

La extracción de los ácidos grasos de las membranas sanguíneas se llevó a cabo siguiendo el método descrito por San Julián et al. (2021). Se realizó el mismo procedimiento para glóbulos rojos y blancos.

El primer paso consiste en mezclar 10 µL de la solución de células sanguíneas preparada en el paso anterior con 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 2,5 % en metanol y un estándar interno C23:0. La mezcla se mantuvo durante 18 horas a una temperatura constante de 50°C para que ocurriese así la transesterificación de los ácidos grasos. Tras esto, se añade a la mezcla 1 mL de n-hexano, el cual permite llevar a cabo la extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES). Se separa el hexano de la fase acuosa mediante pipeta Pasteur de vidrio, y se transfiere a un vial de inyección para cromatografía de gases.

3.4 Determinación de ácidos grasos mediante GC-FID

Para determinar el perfil de ácidos grasos de las membranas, se realiza una cromatografía de gases de alto rendimiento utilizando un sistema de GC Agilent 6850 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Este sistema está equipado con una columna capilar DB-Wax (dimensiones: 60m x 0,25 µm x 0,25 µm) y con un detector de llama (FID) de Agilent (Santa Clara, CA, USA).

Tras la separación y detección GC-FID de los ácidos grasos (Barreiro et al. 2020), cada uno de los picos cromatográficos se integran (primero automáticamente y después se hacen comprobaciones y las correspondientes correcciones para que el pico esté bien integrado) obteniendo así un número que equivale al área del pico. Se realiza después una corrección mediante patrón interno. El software que se utilizó para visualizar y analizar los resultados obtenidos fue GC ChemStation version B.03.02, de Agilent Technologies. Los datos obtenidos de cada integración se expresarán como porcentaje en peso de cada tipo de ácido graso sobre el total de ácidos grasos de la muestra (% w/w del total de ácidos grasos).

Finalmente, se identificaron un total de 34 ácidos grasos diferentes que podemos dividir en tres grupos: ácidos grasos saturados (SFA), que son: C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0 y C24:0; ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), que son: C14:1n-5, C16:1n-9, C16:1n-7, C16:1n-5, C16:1n-13t, C17:1n-9, C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-11, C20:1n-9, C22:1n-11 y C22:1n-9; y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que son: C18:2n-6, C18:2n-6 9-12t, C18:2n-6 9t-12, CLA18:2n-7 9t-11t, CLA18:2n-6 10t-12, C18:3n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C18:3n-3, C18:4n-3, C20:5n-3, C22:5n-3 y C22:6n-3.

3.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 10 (San Diego, CA, USA). La normalidad de los datos fue determinada usando el test de Shapiro-Wilk. Todos los datos siguieron una distribución normal. El primer análisis estadístico que se utilizó fue el Análisis de Componentes Principales (PCA) con el método estandarizado usando una selección de componentes principales basado en análisis paralelos para agrupar a los individuos en función del perfil graso de las membranas de las células sanguíneas. Se realizó uno para los eritrocitos y otro para los linfocitos, puesto que, al ser células diferentes, no se tienen por qué agrupar de la misma manera ni tener la misma composición lipídica.

El segundo de los análisis que se llevó a cabo fueron análisis descriptivos (media, desviación estándar, máximos y mínimos) de cada uno de los grupos de ácidos grasos para los dos tipos celulares: para la línea blanca y para la línea roja.

Por último, se llevaron a cabo varias pruebas ANOVA en dos direcciones para determinar si había una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre ambos grupos, en función del tiempo, o se trataba de una combinación de ambas. Para el análisis *post-hoc* se realizó un test de Tukey.

4. Resultados y discusión

El estudio incluía a nueve vacas de la raza Holstein, de las cuales seis fueron sometidas a un tratamiento veterinario para potenciar la producción láctea (Lactotropina) y las otras tres no recibieron ningún tratamiento.

Los resultados de los ácidos grasos fueron resumidos en seis grupos: ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácidos grasos ω -3 (ω -3), ácidos grasos ω -6 (ω -6) y ácido linoleico conjugado (CLA); aunque estos tres últimos grupos forman parte de los PUFAs.

Tabla 3: Valores medios de cada grupo de ácidos grasos en la membrana de las células sanguíneas obtenidas de vacas lactantes.

Tipo de ácido graso	Componentes de cada grupo	Eritrocitos		Linfocitos	
		Media (%w/w)	SD	Media (%w/w)	SD
SFA	C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0	37.59	6.01	34.65	2.54
MUFA	C14:1n-5, C16:1n-9, C16:1n-7, C16:1n-5, C16:1n-13t, C17:1n-9, C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-11, C20:1n-9, C22:1n-11, C22:1n9	16.44	1.91	16.14	2.37
PUFA	C18:2n-6, C18:2n-6 9-12t, C18:2n-6 9t-12, CLA18:2n-7 9t-11t, CLA18:2n-6 10t-12, C18:3n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C18:3n-3, C18:4n-3, C20:5n-3, C22:5n-3 y C22:6n-3	42.43	7.43	47.69	4.64
ω-3	C18:3n-3, C18:4n-3, C20:5n-3, C22:5n-3, C22:6n-3	4.77	1.45	3.90	0.86
ω-6	C18:2n-6, C18:3n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C18:2n-6 9-12t, C18:2n-6 9t-12	36.17	6.76	42.38	4.41
CLA	CLA18:2n-7 9t-11t, CLA18:2n-6 10t-12	1.27	0.33	1.25	0.42

En la Figura 4 a), a parte de los grupos separados por colores, se puede ver un número representado al lado de cada uno de los puntos, el grupo 1 se refiere a las vacas control, mientras que el grupo 2, está formado por las vacas tratadas con un fármaco veterinario para aumentar la producción láctea (Lactotropina). Como ya se adelantaba anteriormente, las agrupaciones ocurren por días de toma de muestra, y no por tratamiento veterinario.

El día 1 todos los animales se consideran animales control (grupo 1), ya que no da tiempo a que los ácidos grasos de membrana de los eritrocitos cambien, puesto que no ha transcurrido el tiempo suficiente de exposición al fármaco como para que se produzcan cambios en los componentes estructurales de la membrana. Para que la membrana de los eritrocitos cambie, deben darse cambios sostenidos durante un periodo mínimo de tiempo.

Tras esta aclaración, se van a analizar los componentes que agrupan a los animales en función de los días transcurridos, es decir, longitudinalmente en el tiempo. Cabe destacar que los resultados de este análisis no se pueden analizar sin los datos en crudo, ya que, por ejemplo, según el PCA, el grupo del día 1 se debería caracterizar por tener en su composición de membrana un alto porcentaje de ácidos ω -3 con una longitud de cadena de 22 carbonos, puesto que es la zona en la que aparecen los vectores. Sin embargo, si se tienen en cuenta los datos extraídos, se observa que los ácidos grasos más importantes en la composición de las membranas de los eritrocitos de este grupo son ácidos grasos saturados, los poliinsaturados, y, dentro de los poliinsaturados, los ácidos grasos ω -6, y que la suma de sus vectores hace que este grupo se encuentre en la posición en la que está en el gráfico.

Los puntos pertenecientes al día 7 tienen una proporción menor de ácidos grasos saturados y una concentración importante de ácidos grasos poliinsaturados y ω -6 en la membrana de sus eritrocitos, es por esta razón por la que los vectores aparecen en el primer cuadrante de la imagen. En comparación con el día 1, se puede apreciar claramente cómo los SFAs disminuyen su importancia en la membrana y los PUFA's la aumentan.

En cuanto al grupo del día 50, si se analizan los datos resumen (correspondientes a los grupos en los que se dividen los ácidos grasos: SFA, MUFA, PUFA, ω -6, ω -3 y CLA), se puede apreciar que los ácidos grasos saturados adquieren una concentración muchísimo más alta en las membranas eritrocitarias que en los casos anteriores, y, que

en su conjunto, los ácidos grasos poliinsaturados y los ω -6 disminuyen su concentración en la misma proporción en la que los ácidos grasos aumenten.

Los puntos que representan el día 95 de estudio, se sitúan en una zona muy cercana a los puntos del día 50, de forma general, los del día 95 se encuentran en valores del eje Y un poco más bajos, mientras que los valores del eje X son un poco más elevados. Sin embargo, no dejan de estar en la misma zona. De esta manera, se puede establecer que las membranas de los eritrocitos del día 95 tienen aumentados, de forma considerable, los ácidos grasos saturados, y, consecuentemente, los PUFA y ω -6 adquieren unos valores más bajos.

Por último, si se analiza la agrupación para el último día de análisis, el día 214, se puede ver que los puntos se sitúan muy cercanos y claramente diferenciados. Estos eritrocitos se caracterizan por tener en su membrana una mayor concentración de ácidos grasos C18:2(n-6) y otros ácidos grasos C18 con dos o tres insaturaciones.

Los datos que nos aporta la Figura 4 son que el tratamiento veterinario con rbST no modifica la composición de los ácidos grasos de membrana, mientras que el tiempo sí que tiene un efecto importante en los patrones de cambio de la composición de la membrana eritrocitaria, y que los ácidos grasos saturados y los poliinsaturados y ω -6, siguen, aparentemente, una proporción inversa, es decir, cuando aumenta el porcentaje de ácidos grasos saturados, disminuye el de poliinsaturados y ω -6, y viceversa.

4.1.1.1 Grupo de validación o control externo

El día 98 del estudio, se tomaron muestras de sangre de 2 animales de la misma granja, con el objetivo de validar los resultados obtenidos. Estas vacas fueron seleccionadas aleatoriamente entre las disponibles en el rebaño en lactación, y aparecen en la Figura 4 representadas con un punto de color gris cada una. Uno de estos animales controles externos aparece muy alejado de cualquier otro punto, creando así un grupo totalmente diferenciado de los estudiados. Este perfil lipídico muestra que, el animal, al no encontrarse en las mismas condiciones exógenas y endógenas en las que se encontraban los sujetos de estudio, posee unos ácidos de membrana en proporciones muy diferentes. Si se observa la Figura 4 se puede apreciar que para que el vector quede en la zona en la que aparece representado, este primer control externo debe poseer un alto porcentaje de ácidos grasos saturados, y, que los ácidos grasos monoinsaturados y los poliinsaturados tengan, entre los dos juntos, una abundancia inferior. Por tanto, este control externo, tendrá un porcentaje de SFAs muy elevado comparado con las vacas sincronizadas en cuanto al momento de lactación. Se debe

tener en cuenta que esta vaca no estaba previamente seleccionada, por tanto, no conocemos su edad, su momento de lactación, o, incluso si estaba preñada o no, al igual que sus condiciones ambientales, como puede ser la dieta.

Este primer control externo nos indica que las vacas con similitudes en cuanto al momento de lactación, edad, gestación y otros factores, tienen un perfil lipídico de la membrana de las células sanguíneas de la línea roja que varía de una manera muy similar en función del tiempo, sin embargo, los animales ajenos a las características mencionadas, no se pueden englobar en un mismo perfil lipídico en la membrana de este tipo celular.

Otros factores importantes que parecen intervenir en la composición lipídica de la membrana es la edad del animal y los cambios hormonales asociados a ella, ya que son de los factores que afectan al metabolismo endógeno de los ácidos grasos (Lankinen et al., 2018). Este control externo no se eligió bajo los mismos criterios que los animales sometidos al estudio, sino que se trataba de una vaca totalmente ajena y sobre la que no se tuvo en cuenta su edad; tampoco se tuvo en cuenta su época de lactación, debido a la cual el animal podría experimentar un balance más negativo que el asociado al calor (Nielsen et al., 2003) o el factor de gestación, debido al cual, las vacas experimentan un descenso de ácidos grasos poliinsaturados (ω -3 y ω -6) por los requerimientos del feto (Ghebremeskel et al., 2000).

En la siguiente tabla se comparan los valores medios de los animales utilizados en el estudio y los valores obtenidos de la vaca control externo para analizar así sus diferencias:

Tabla 4: Comparación de valores medios de los ácidos grasos en la membrana de los RBCs y de los valores de los ácidos grasos de los RCB del control externo diferenciado.

	Valores medios (%w/w)	Control externo (%w/w)
SFA	37.59	54.53
MUFA	16.44	21.74
PUFA	42.43	18.93
ω-3	4.77	2.91
ω-6	36.17	14.75
CLA	1.27	1.27

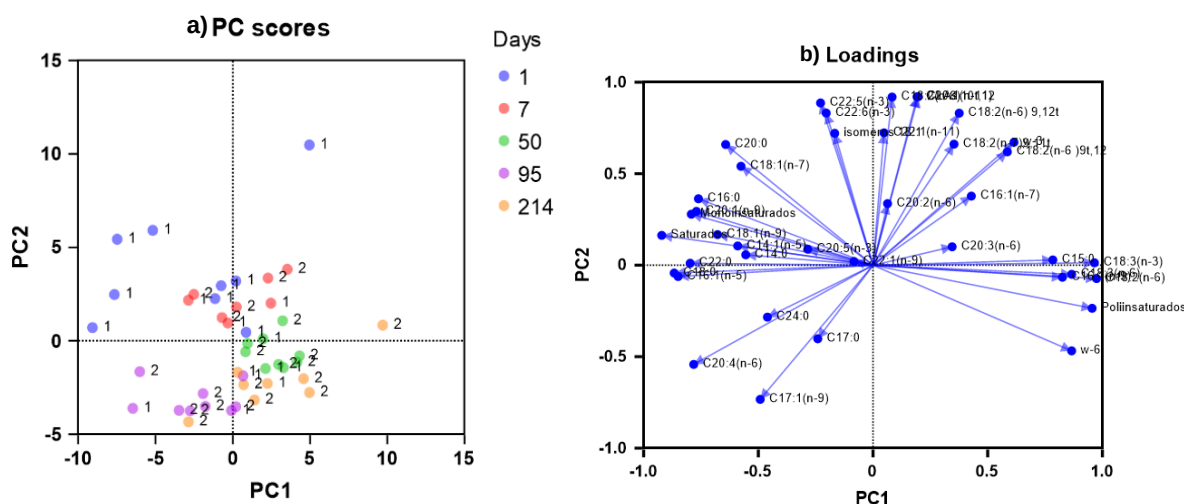
Tal y como se predecía a partir de la Figura 4, se ve cómo hay una cantidad muy importante de SFA y cómo los PUFA en general, pero sobre todo los ω -3 y ω -6 tienen una importancia muy escasa comparada con los valores medios. A partir de la información reflejada en la Tabla 4, se puede afirmar que la vaca perteneciente al control

externo está gestando, puesto que los ácidos grasos que poseen una importancia menor son, como ya se mencionaba anteriormente, los ácidos ω -3 y ω -6 (Ghebremeskel et al., 2000). Este descenso producido en los PUFA es un importante indicador de que el animal se encuentra en un estado de embarazo (Ghebremeskel et al., 2000).

El segundo de los controles externos sí que tiene un perfil similar al del resto de animales, casi llegando a agruparse con los animales objetos de estudio los días 50 y 95. Aunque se trate de un perfil lipídico cercano a estos días, se ve que hay un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en la membrana de los eritrocitos de la vaca control externo que en las vacas del estudio. Esto demuestra que el hecho de que las vacas no se encuentren en el mismo momento posparto, de lactación, de edad, etc., no tienen por qué experimentar los mismos cambios en las membranas de los eritrocitos, independientemente de la temperatura ambiental, ya que hay otros factores que intervienen en la incorporación de ácidos grasos a las membranas plasmáticas de las células sanguíneas en general, y, en particular, de los glóbulos rojos.

4.1.2 Linfocitos

Los estudios también se desarrollaron en los ácidos grasos de membrana de linfocitos, que, como muestra la Figura 5, en esta ocasión, no se encuentra una separación clara entre los linfocitos en función del tiempo. Tampoco se aprecia una agrupación en función del tratamiento o no.



hay una tendencia positiva en el eje Y, pero no hay demasiada diferencia entre los días 1 y 7, ya que no encontramos una distribución homogénea para ninguno de los dos grupos. Se puede intuir vagamente que el día 1 los animales tenían una mayor concentración de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en la membrana de sus linfocitos. Por su parte, los puntos del día 7, están más próximos entre sí, que los del día 1, por tanto, podemos decir que hay más uniformidad en la distribución de los ácidos grasos de las membranas de los linfocitos el día 7 que el día 1. Como de forma general, los puntos del día 7 aparecen más próximos al eje Y, se puede intuir que la concentración de ácidos grasos monoinsaturados y saturados disminuye con respecto al día anterior, y, como consecuencia, que los ácidos grasos poliinsaturados y/o los ω -6, aumentan su concentración.

La distribución de los puntos de los ácidos grasos del día 50, tampoco es demasiado uniforme, pero sí se puede ver que más o menos, se encuentran entre los primeros (1 y 7) y los últimos días (95 y 214) si se observa el eje Y.

Por último, en cuanto a los dos últimos días de análisis (95 y 214 días), se ve que apenas hay diferencia entre ambos. Los dos tienen una distribución similar tanto en el eje X como en el Y. Si se quisiera precisar un poco, se podría decir que es probable que en el día 214 haya una proporción ligeramente mayor de ácidos grasos poliinsaturados y de ω -6, aunque las diferencias que se pueden apreciar con este análisis no son evidentes.

Tras el análisis del PCA de la línea roja y el de la línea blanca, se puede hacer una comparación de ambos para ver si las células sanguíneas de la línea roja y las de la línea blanca siguen un patrón similar de captación de ácidos grasos de membrana. A priori, podemos observar que los glóbulos rojos sí que siguen un patrón de captación de ácidos grasos en función del tiempo, mientras que los linfocitos, no siguen este patrón tan diferenciado. Es cierto que sí que se puede intuir una tendencia a la adquisición de ácidos grasos poliinsaturados y ω -6 por parte de los linfocitos con el paso del tiempo, mientras que se pierden ácidos grasos saturados y monoinsaturados, pero esta tendencia no es lo suficientemente clara como para separar por días los perfiles lipídicos como en el caso anterior.

4.2 Evolución temporal de los ácidos grasos de membrana de células sanguíneas bovinas

4.2.1 Eritrocitos

Tras el primer análisis, se estudiaron los cambios de los seis grupos de los que se hablaba anteriormente en función del tiempo (SFAs, MUFAs, PUFAs, ω -6, ω -3 y CLAs), ya que, dependiendo del tratamiento, ya se ha observado que los ácidos grasos de membrana de los dos tipos celulares utilizados no cambian de manera uniforme. Los primeros grupos de ácidos grasos de membrana de los eritrocitos que se sometieron al análisis fueron los ácidos grasos saturados y poliinsaturados, y con los poliinsaturados, los ω -6, que son los PUFAs con mayor presencia. En la Figura 6 se muestran los cambios experimentados por estos grupos de ácidos en la membrana de los eritrocitos.

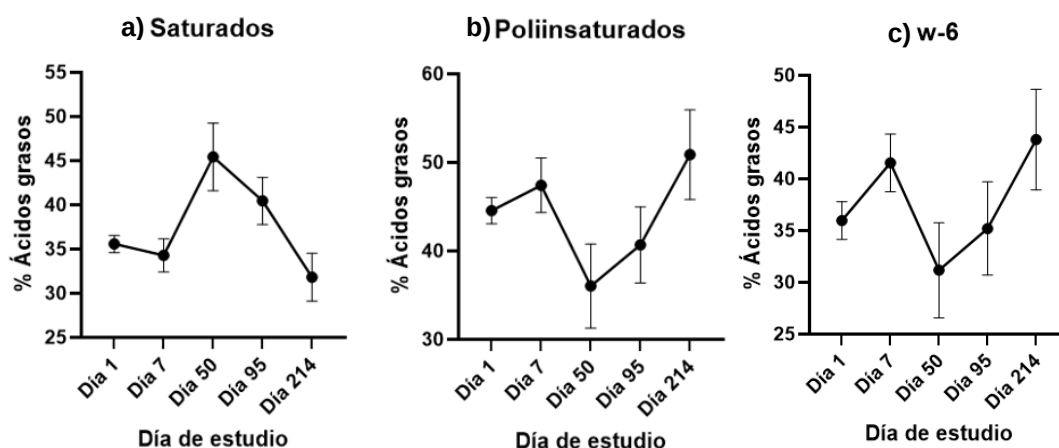


Figura 6: Evolución ácidos grasos saturados (a), poliinsaturados (b) y ω -6 (c) en la membrana de los eritrocitos en ganado bovino de leche.

Si se analizan los cambios en función del tiempo de los ácidos grasos saturados en los glóbulos rojos, se ve cómo los primeros días el porcentaje de ácidos grasos saturados en la membrana es mucho menor que el día 50, donde se detecta un pico en el que el porcentaje de ácidos grasos saturados en la membrana supera el 45 %. El día 95 sigue habiendo en la membrana un porcentaje de ácidos grasos saturados muy alto, ya que alcanza el 40 %, pero es menor que en el día 50. Por último, el día 214, vemos que la importancia de los ácidos grasos saturados desciende considerablemente, alcanzando su punto más bajo en el estudio, con un porcentaje un poco superior al 30 %.

En los gráficos de la Figura 6, se puede observar que los ácidos grasos saturados no son los únicos que cambian su concentración. Esto es lógico, ya que la membrana de los eritrocitos, aunque sea muy flexible, debe mantener siempre la misma superficie, por lo que si aumenta la concentración de un tipo de ácidos grasos en la membrana, debe

disminuir en la misma proporción el conjunto de ácidos grasos restantes. Los ácidos grasos que tienen un patrón inverso a los SFAs son los PUFAs y los ácidos grasos ω -6. Los ácidos grasos ω -6, son un tipo de PUFAs, por lo que es normal que cambien siguiendo el mismo patrón. En la Figura 6b, se ve la evolución del porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados en función de los días de análisis, y, por tanto, en función del tiempo.

La primera observación que se puede hacer en este gráfico, es que es varía de forma inversa al gráfico de los ácidos grasos saturados, por tanto cuando estos últimos aumentan su porcentaje, los PUFAs disminuyen su porcentaje, y viceversa: cuando los ácidos grasos poliinsaturados aumentan su concentración en la membrana plasmática de los eritrocitos, los saturados disminuyen la suya. Como se predecía en la Figura 4, la suma de estas dos variantes diferencia la posición en la que se encontraban, ya que son los grupos de ácidos grasos con mayor porcentaje en la membrana plasmática de los hematíes. Aun así, si se mantuviesen estables y no fluctuasen, no serían el elemento diferenciador.

Tras la deducción realizada con el PCA, se puede ver que los resultados predichos eran correctos, ya que los ácidos grasos ω -6 siguen un patrón muy similar al de los ácidos grasos poliinsaturados. La variabilidad mostrada en el gráfico es la misma, lo único, que los porcentajes de ácidos grasos ω -6 son inferiores que los de los ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos ω -6 son un tipo de ácido graso poliinsaturado, concretamente, el que más peso tiene en la membrana celular de los eritrocitos, por eso sigue el mismo patrón que los PUFAs.

La mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados no pueden ser sintetizados por los mamíferos, sino que, a partir de la incorporación de los ácidos linoleico y linolénico, los animales son capaces de sintetizar el resto de ácidos grasos poliinsaturados necesarios (Sardesai, V.M.,1992). Estos ácidos son ácidos grasos esenciales, por lo que al reducir la ingesta diaria, los ácidos grasos poliinsaturados también disminuyen su concentración tanto en sangre, como en las membranas de las células sanguíneas de la línea roja.

En el caso de los eritrocitos, se ve cómo los patrones de cambio en las membranas siguen los patrones del calor a los que se someten los animales, puesto que los primeros días de estudio (día 1 y día 7) son los primeros días de junio, época en la que comienza a hacer calor, pero no demasiado.

En el día 50 se observa un gran pico que indica un aumento muy considerable de los ácidos grasos saturados en sangre, este día se corresponde con la fecha del 26 de julio,

en la que hace mucho calor: ese día, según los registros de la estación meteorológica de Becerreá de la AEMET, hubo una temperatura máxima de 25°C, y los días anteriores 26 y 27°C. No se trata de un calor excesivo en el que los animales se encuentren en condiciones de estrés severo, sin embargo, al no estar acostumbrados a dichas temperaturas, es muy probable que experimentasen un ligero estrés durante esos días del verano, y por eso, aumentase la concentración de ácidos grasos saturados en las membranas de sus glóbulos rojos. Lógicamente, este cambio no se produce por el efecto del calor en tres días, sino los cambios se producen por todo el estrés generado durante el verano.

El día 95 los niveles de SFA son más bajos que en pleno verano, sin embargo, no es una variación demasiado grande. Esto se debe a que las vacas se han sometido durante todo el verano a calor, y el patrón de cambio de los ácidos grasos de las membranas eritrocitarias no es lo suficientemente rápido como para que varíe demasiado en un periodo de tiempo tan corto. El día 9 de septiembre de 2016 se registraron unas temperaturas máximas de 16°C, por lo que los animales ya comenzaban a no sufrir estrés por las altas temperaturas.

Por último, el último día de registro, se corresponde con la época invernal, una época fría del año en la esta movilización de grasas generada por la disminución de la ingesta, no se produce, y, en la que los ácidos grasos saturados de las membranas eritrocitarias alcanzan la concentración mínima registrada.

Esta variación en los ácidos grasos saturados se debe a un aumento de la movilización de las reservas grasas del animal, experimentado debido a los cambios de temperatura asociados a la época del año. Los días en los que el animal se ha expuesto a más calor, el balance energético de los animales es más negativo, ya que ingieren una menor cantidad de comida. La energía necesaria para realizar todos los procesos fisiológicos proviene de las reservas energéticas, haciendo así que aumenten las concentraciones de ácidos grasos saturados en sangre, y, que los eritrocitos, capten este tipo de ácidos grasos en sus membranas (Joo et al., 2021).

Los ácidos grasos poliinsaturados también siguen el patrón de cambio estacional que se observaba en los ácidos grasos saturados. Sin embargo, estos ácidos grasos disminuyen su concentración en la membrana eritrocitaria durante los periodos más calurosos de año. Por tanto, se puede decir que cuando los ácidos grasos poliinsaturados reducen su concentración en la membrana plasmática, los ácidos grasos

que los sustituyen son los saturados, puesto que son los más abundantes en las reservas energéticas.

En segundo lugar, los datos de los ácidos grasos monoinsaturados y su evolución se analizarán en función del tiempo. Los datos se muestran en la Figura 7.

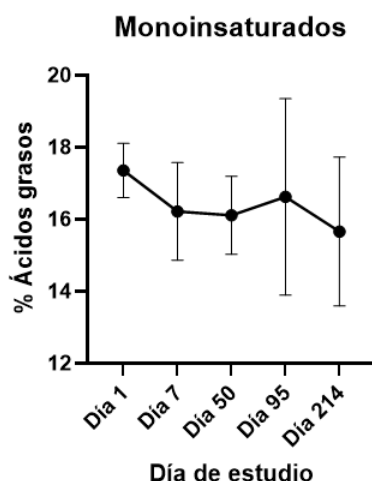


Figura 7: Evolución ácidos grasos monoinsaturados en la membrana de los eritrocitos en ganado bovino de leche.

Como bien se aprecia en la Figura 7, y bien se dedujo a partir de la Figura 4, los ácidos grasos monoinsaturados, no fluctúan demasiado en función del tiempo, se aprecia que varían entre el 15 y el 18 % en la composición de la membrana. Sí que se observa una ligera tendencia a la disminución de esta familia lipídica, ya que el día 1 el porcentaje de MUFA es superior al del último día. Aun así, este descenso no ocurre de una forma pronunciada y constante.

A diferencia de los ácidos grasos saturados, los monoinsaturados no se ven afectados por los cambios de temperatura producidos debido a la época del año, sino que se mantienen estables. En todos los días de estudio solo hay variaciones del 3 %, y no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores obtenidos durante los diferentes días del estudio, por lo que se puede afirmar que esta familia lipídica no adquiere valores diferentes ni en función del tiempo, ni en función de si el animal se ha sometido a tratamiento o no, ni una combinación de ambas.

En períodos de tiempo inferiores a un año en los que el animal adulto no sufre cambios dietéticos, cambios hormonales asociados a la edad (menarquia, menopausia, estrés continuado, etc.) ni cambios en las condiciones externas más allá de la temperatura ambiental y el ciclo normal de lactación, los ácidos grasos monoinsaturados se mantienen estables en las membranas plasmáticas eritrocitarias.

El siguiente de los grupos en los que se dividió a los ácidos grasos de membrana se corresponde a los ácidos grasos ω -3, cuyo porcentaje en las membranas de los eritrocitos en función del tiempo está representada en la Figura 8, que se presenta a continuación:

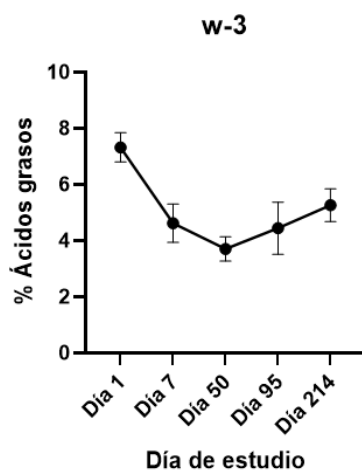


Figura 8: Evolución ácidos grasos ω -3 en la membrana de los eritrocitos en ganado bovino de leche.

En esta Figura 8 se puede ver cómo el porcentaje de ácidos grasos ω -3 no es muy elevado en general (si se compara con la presencia de otros ácidos grasos), aun así, se aprecia un claro patrón de disminución de los ácidos grasos ω -3 hasta el día 50, donde se alcanza el porcentaje mínimo. A partir de este punto, el porcentaje de ácidos grasos ω -3 en la membrana de los eritrocitos va a aumentar, pero no hasta los niveles iniciales.

El último de los gráficos representativos de la evolución de los ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos en función del tiempo se presenta a continuación, y muestra la evolución de los CLAs.

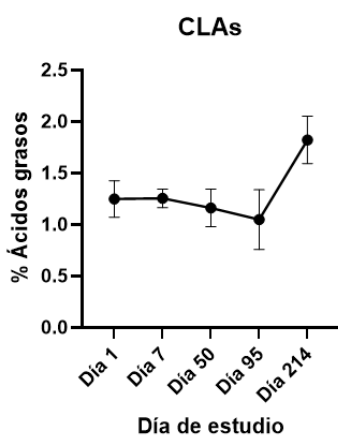


Figura 9: Evolución ácidos grasos CLAs en la membrana de los eritrocitos en ganado bovino de leche.

La Figura 9 muestra que los CLAs no son un tipo de ácido graso que tenga una abundancia especialmente notable en las membranas de los eritrocitos, puesto que el porcentaje máximo alcanzado por este grupo molecular está por debajo del 2 %. En

cuanto a su evolución temporal, se aprecia que se mantienen estables en el tiempo hasta el día 95. Es cierto que su porcentaje va disminuyendo muy ligeramente hasta el cuarto día de análisis, pero la disminución no se produce de manera brusca. Por otro lado, el día 214 de análisis se ve que el porcentaje de CLAs en la membrana del glóbulo rojo aumenta de manera exagerada, llegando a alcanzar casi el doble del valor del día 95.

Los CLAs y los ácidos grasos ω -3 son metabolitos que intervienen en el estrés oxidativo generado por el balance energético negativo. El hecho de que los CLAs se mantengan estables en la membrana de los eritrocitos durante todos los días de análisis excepto durante los últimos, apunta a que los CLAs presentes en sangre se estén utilizando para evitar daños importantes en las células y el ADN, y solo se mantenga en la membrana la concentración mínima necesaria su el correcto funcionamiento. Cuando el estrés oxidativo es menor, debido a que es invierno, las temperaturas son más bajas, y, por tanto, no existe el factor externo de balance energético negativo causado por una reducción del consumo de comida, se ve cómo la concentración de CLAs alcanza niveles que doblan los registrados anteriormente (Veshkini et al., 2023).

Los ácidos grasos monoinsaturados, los CLAs y los ω -3 siguen un patrón de cambio diferente al de los SFA, PUFA y ω -6. El hecho de que varíen siguiendo un patrón diferente indica que este tipo de lípidos presentes en las membranas eritrocitarias no se ven afectados por las variaciones estacionales de la temperatura.

El calor no es el único factor que afecta al balance energético negativo, sino que el momento de la lactación también influye, y también supone un balance negativo energéticamente hablando durante la época de lactancia (Nielsen et al., 2003). Sin embargo, en los animales objeto de estudio no se aprecia diferencia entre unos y otros porque todos se encuentran en el mismo momento de lactación.

4.2.2 Linfocitos

A continuación, se analizan los gráficos del porcentaje de ácidos grasos en las membranas de las células de la línea blanca en función del tiempo. Se podrán observar así los cambios que se producen en la membrana plasmática de los linfocitos del ganado bovino a lo largo del tiempo.

El primero de los grupos que será comentado es el de los ácidos grasos saturados, cuyos resultados se muestran en la Figura 10.

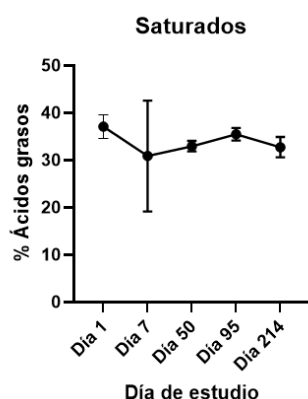


Figura 10: Evolución ácidos grasos saturados en la membrana de los linfocitos del ganado bovino de leche.

En la Figura 10 se ve cómo el porcentaje de los ácidos grasos saturados de la membrana de los linfocitos se mantiene relativamente estable durante todo el tiempo de análisis, ya que sus valores medios no fluctúan mucho y se mantienen entre el 30 y el 38 % de los ácidos grasos totales. El punto más bajo se observa el día 7, donde el porcentaje medio de ácidos grasos en la membrana es un poco superior al 30 %. Por otro lado, el porcentaje más alto se encuentra el primer día, en el que su valor medio fue casi del 40 %.

La Figura 11 es la que se muestra bajo este párrafo. En ella se aprecia la evolución del porcentaje de los ácidos grasos monoinsaturados que conforman la membrana celular de los glóbulos blancos del ganado bovino.

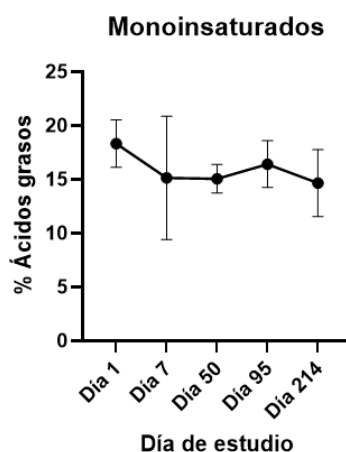


Figura 11: Evolución ácidos grasos monoinsaturados en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche.

Al igual que en el caso de los eritrocitos, el gráfico no fluctúa demasiado, sino que más bien se mantiene constante en el tiempo, pues todos los valores entran en el rango de entre el 15 y el 20 % de la composición total de este tipo lipídico. El valor más alto se

sitúa en torno a una composición del 17 %, y el mínimo, no está muy claro en qué día se produce, aun así, los tres posibles mínimos (días 7, 50 y 214) están en torno al 15 %.

Si se compara este gráfico (Figura 11) y el anterior (Figura 10), se ve que la forma de las fluctuaciones es muy similar, por lo que se podría decir que estos dos tipos de ácidos grasos varían siguiendo el mismo patrón. Esto se ve en el día 1, donde en ambos gráficos se sitúa el máximo absoluto de la gráfica, los días siguientes de análisis desciende el porcentaje de ambos ácidos grasos, aunque en este punto el patrón difiere un poco, ya que el día 50 los ácidos grasos saturados aumentan su presencia en la membrana, mientras que los monoinsaturados se mantienen. Sin embargo, el día 95 se vuelve a apreciar un máximo relativo en ambos casos para que, finalmente, el último día de análisis ambos porcentajes desciendan. Por tanto, se puede establecer que la evolución entre la concentración de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en la membrana de los linfocitos sigue un patrón evolutivo similar.

El siguiente gráfico que se muestra (Figura 12) representa la evolución del porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados en el mismo tipo celular que las dos figuras anteriores: los linfocitos.

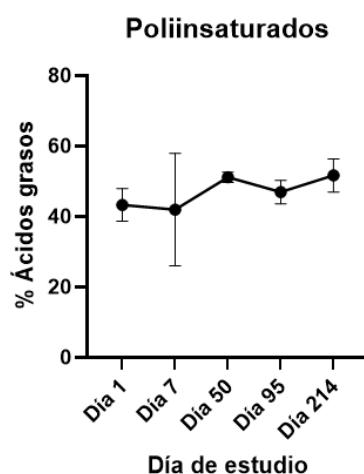


Figura 12: Evolución ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche.

En el gráfico se observa que los ácidos grasos poliinsaturados conforman una parte muy importante de la membrana celular de los linfocitos, ya que su proporción está entre el 40 y el 55 % de los ácidos grasos totales.

Los dos primeros días de análisis, los ácidos grasos poliinsaturados tienen los valores más bajos, cerca del 40 %, sin embargo, a partir del día 50, el porcentaje de PUFAs

llega casi al 50 %, y, aunque el día 95 vuelve a descender un poco, el día 214 vuelve a alcanzar, e incluso superar, el porcentaje de los ácidos grasos del día 50.

A continuación, se muestra la Figura 13, en la que se aprecia la evolución de los ácidos grasos ω -3.

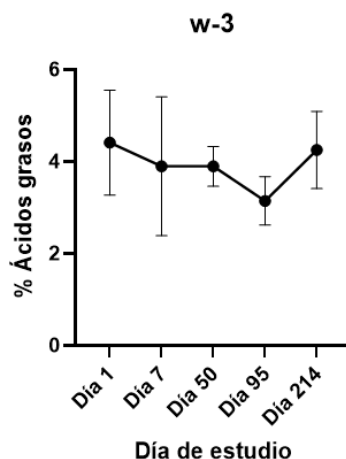


Figura 13: Evolución ácidos grasos ω -3 en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche.

En general, en cuanto a cantidad se refiere, en ninguno de los días los ácidos grasos ω -3 tienen un porcentaje importante en la composición de la membrana. El día 1 alcanza un valor un poco inferior al 4'5 %, siendo el valor más alto que se va a encontrar en este grupo de ácidos grasos. Los días 7 y 50 tras el comienzo del seguimiento, los valores son muy similares, en torno al 4 %. Sin embargo, el día 95 se ve cómo se produce un descenso importante en el que los valores de los ácidos grasos ω -3 apenas llegan al 3 % de la composición total de la membrana. Por último, el día 214 se recuperan los valores, llegando casi a los valores del día 1. Este ascenso es el cambio más pronunciado que se puede observar en el gráfico, ya que su pendiente es la más inclinada.

El siguiente grupo en el que se observa la evolución de la composición de la membrana es en el de los ácidos grasos ω -6, representados en la Figura 14.

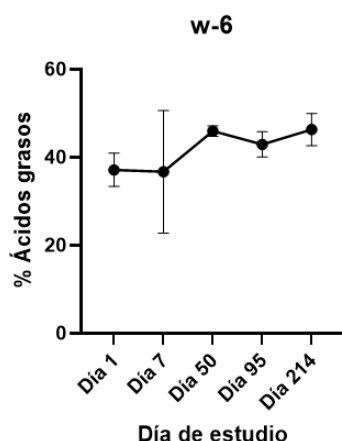


Figura 14: Evolución ácidos grasos ω -6 en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche.

Al igual que en el caso de los eritrocitos, en los linfocitos, los ácidos grasos ω -6 siguen un patrón de evolución muy similar al de los ácidos grasos poliinsaturados. Su presencia en la membrana es un poco menor, pero la diferencia no es especialmente importante. En la Figura 14 se aprecia que, los primeros días, los ácidos grasos ω -6 se mantienen estables en la membrana. Sin embargo, el día 50 sufren una potente subida, llegando a conformar algo más del 45 % de los ácidos grasos totales de la membrana plasmática de los linfocitos. El siguiente día de análisis (día 95) se observa una pequeña bajada del porcentaje de este componente lipídico, para que, finalmente, el día 214 vuelva a tener una presencia similar a la del día 50, incluso un poco más alta.

Finalmente, el último grupo que se sometió al análisis es el de los CLAs, cuya evolución porcentual en la membrana en función del tiempo se muestra en la Figura 15, que aparece a continuación:

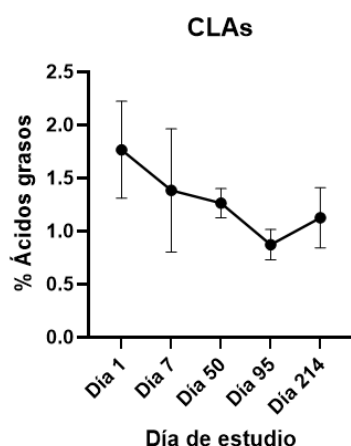


Figura 15: Evolución ácidos grasos CLAs en la membrana de los linfocitos en ganado bovino de leche.

La Figura 15 muestra que el grupo representado no tiene una gran presencia en la membrana de este tipo celular, ya que el valor máximo alcanzado en toda la evolución no alcanza el 2 % de los ácidos grasos totales. En cuanto a su evolución, los CLAs muestran una fuerte bajada en los cuatro primeros días de estudio. Entre el día 1 y el 95 hay una diferencia de casi un 1 %. Esta diferencia es muy grande, ya que supone una caída de los CLAs superior al 50% de los datos iniciales. El día 214 aumenta y se recuperan un poco los valores, aun así, apenas se llega a superar el 1 % de la composición de ácidos grasos de la membrana.

Las membranas de los linfocitos, al igual que las de los eritrocitos, presentan una evolución temporal significativa, sin embargo, no se ha encontrado ningún patrón de cambio en ellos. A diferencia de los glóbulos rojos, la significación de los resultados obtenidos para linfocitos no era tan evidente, y no se producía en todos los días (el nivel de significación se muestra en las Tablas 5 y 6 del apartado 4.3).

4.2.3 Comparación entre eritrocitos y linfocitos

El patrón de cambio que se aprecia en los linfocitos es muy diferente al que se ha observado en los eritrocitos. Esto se debe a que se analizan células muy distintas, que poseen vidas medias muy distintas, ya que la vida media de los linfocitos dura tan solo 18 días (Scott et al., 1973), mientras que la de los eritrocitos es muy superior (120 días) (Nguyen et al., 2023). En los siguientes gráficos (Figura 16) se muestran las diferencias entre los ácidos grasos de membrana de los eritrocitos y de los linfocitos.

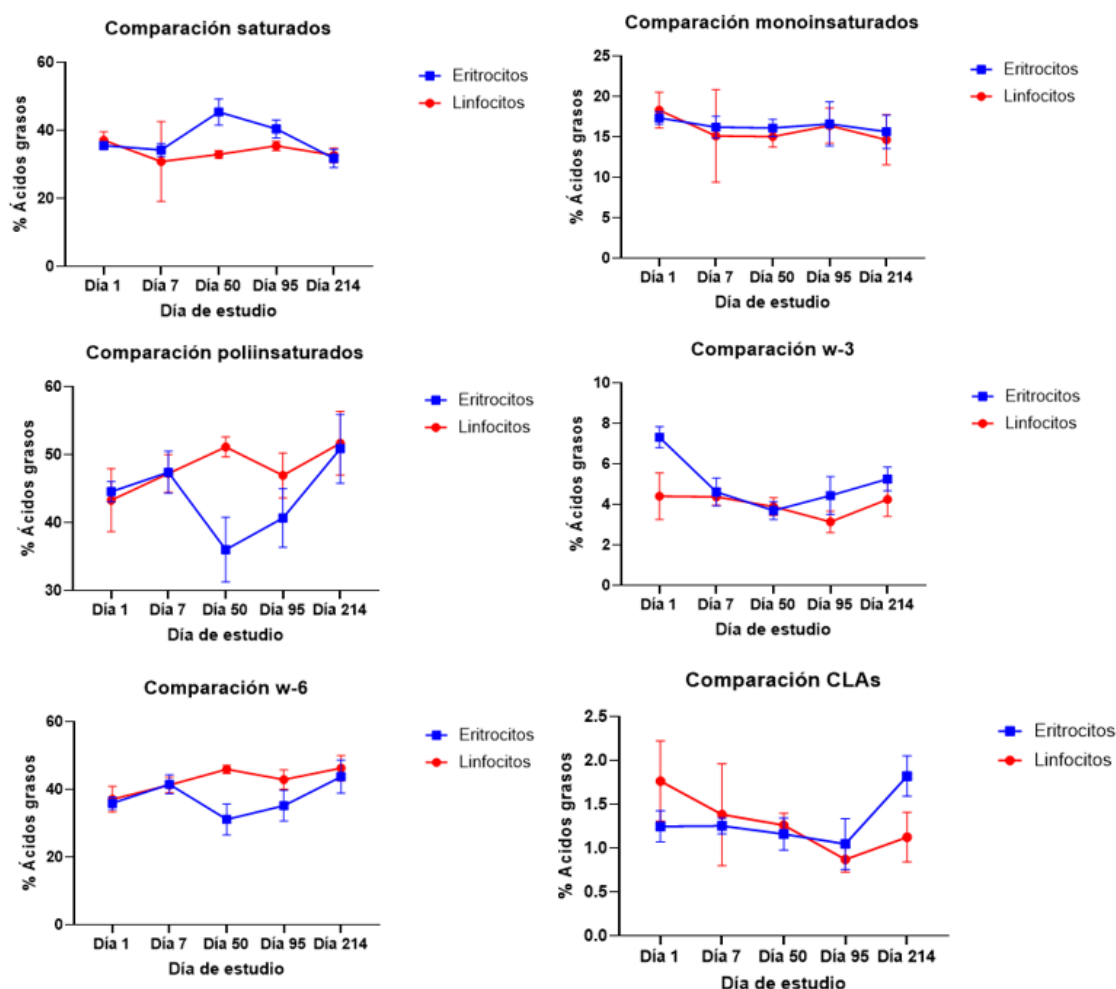


Figura 16: Comparación de la evolución de los diferentes ácidos grasos en las membranas plasmáticas de eritrocitos y linfocitos en ganado bovino de leche.

Como se aprecia en la Figura 16, los patrones de cambio en los dos tipos celulares son muy diferentes para la mayoría de los ácidos grasos. Los MUFA y los CLAs son los únicos ácidos grasos que cambian con un patrón parecido en ambas células, por tanto, como se puede apreciar en la Tabla 5, los cambios significativos ($p < 0.05$) que se producen son en función del tiempo o de la interacción entre el tiempo y el tipo celular, y no del tipo celular exclusivamente. Sin embargo, el resto de ácidos grasos sí que

sufren cambios significativos ($p < 0.05$) en los porcentajes de ácidos grasos de membrana causados por el tipo celular.

Tabla 5: Comparación valores medios entre linfocitos y eritrocitos del ganado bovino de leche y significación de sus diferencias.

Tipo de ácido graso	Eritrocitos		Linfocitos		Valores P		
	Media (%w/w)	SD	Media (%w/w)	SD	Tiempo	Tipo celular	Interacción
SFA	37.59	6.01	34.54	2.44	<0.0001****	0.0002***	<0.0001****
MUFA	16.44	1.91	16.15	2.39	0.03*	0.39	0.73
PUFA	42.43	7.43	47.80	4.64	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****
ω-3	4.77	1.45	3.94	0.84	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****
ω-6	36.17	6.76	42.44	4.45	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****
CLA	1.27	0.33	1.27	0.42	<0.0001****	0.70	<0.0001****

Estos datos indican que la captación de ácidos grasos saturados, poliinsaturados, ω-6 y ω-3, es diferente en eritrocitos y linfocitos, y, por tanto, que son los ácidos grasos que más suelen variar de manera fisiológica en las membranas de las células sanguíneas, tanto de la línea blanca como de la línea roja. Por otro lado, los MUFA y los CLAs son ácidos grasos más estables, cuya concentración no suele variar en función del tipo celular. El cambio se produce debido al tiempo y a la interacción del tiempo con el tipo celular.

De forma general, tras ver estos resultados, se podría afirmar que los linfocitos modifican menos su membrana debido al escaso tiempo que están circulando en sangre, mientras que los glóbulos rojos están más expuestos a los cambios metabólicos que se experimentan en el organismo de estudio, por eso son células con proporciones de ácidos grasos más cambiantes a lo largo del tiempo. Por su parte, los linfocitos desempeñan una función fundamental: la defensa del organismo de patógenos externos. Debido a su función, los linfocitos necesitan una estructura lipídica más estable que no varíe tan fácilmente como la de los glóbulos rojos, puesto que una alteración de la composición de la membrana podría afectar a la presentación de antígenos, a la producción de citoquinas o a la propia proliferación de los linfocitos (Calder et al., 2002).

4.3 Influencia del tratamiento con rbST en los ácidos grasos de membrana de células sanguíneas bovinas

Como se explica en la introducción, la somatotropina recombinante es una hormona exógena, que, entre sus muchas funciones, estimula la lipólisis del ganado. El incremento de los ácidos grasos en sangre, causado por la movilización de las reservas

grasas a causa del uso de rbST, puede afectar a la concentración de ácidos grasos en sangre, y, como consecuencia, si se mantiene en el tiempo, a la membrana de las células sanguíneas.

La principal razón por la que se estudian los ácidos grasos en la membrana de las células sanguíneas es porque la somatotropina es una hormona lipolítica, por tanto, estimula la utilización de grasas como fuente de energía. La principal consecuencia de la acción lipolítica de esta hormona es el aumento de los ácidos grasos libres en sangre, de forma que su incorporación en las células sanguíneas se producirá si esta acción se sostiene en el tiempo.

Si estos ácidos grasos se incorporan a las membranas de las células sanguíneas, podríamos observar una relación entre la cantidad de somatotropina utilizada y el tipo de ácidos grasos que hay en las células sanguíneas del ganado vacuno (Body et al., 1988).

Uno de los objetivos del estudio era demostrar la alteración de la membrana de las células sanguíneas causada por el uso de este tratamiento potenciador de la lactación bovina y evaluar así sus efectos sobre el metabolismo animal. Para analizar las diferencias en la composición de membrana de las células sanguíneas de los animales tratados con Lactotropina, se realizaron estudios estadísticos comparativos por cada tipo de ácido graso en cada uno de los dos tipos celulares analizados en el trabajo (eritrocitos y linfocitos).

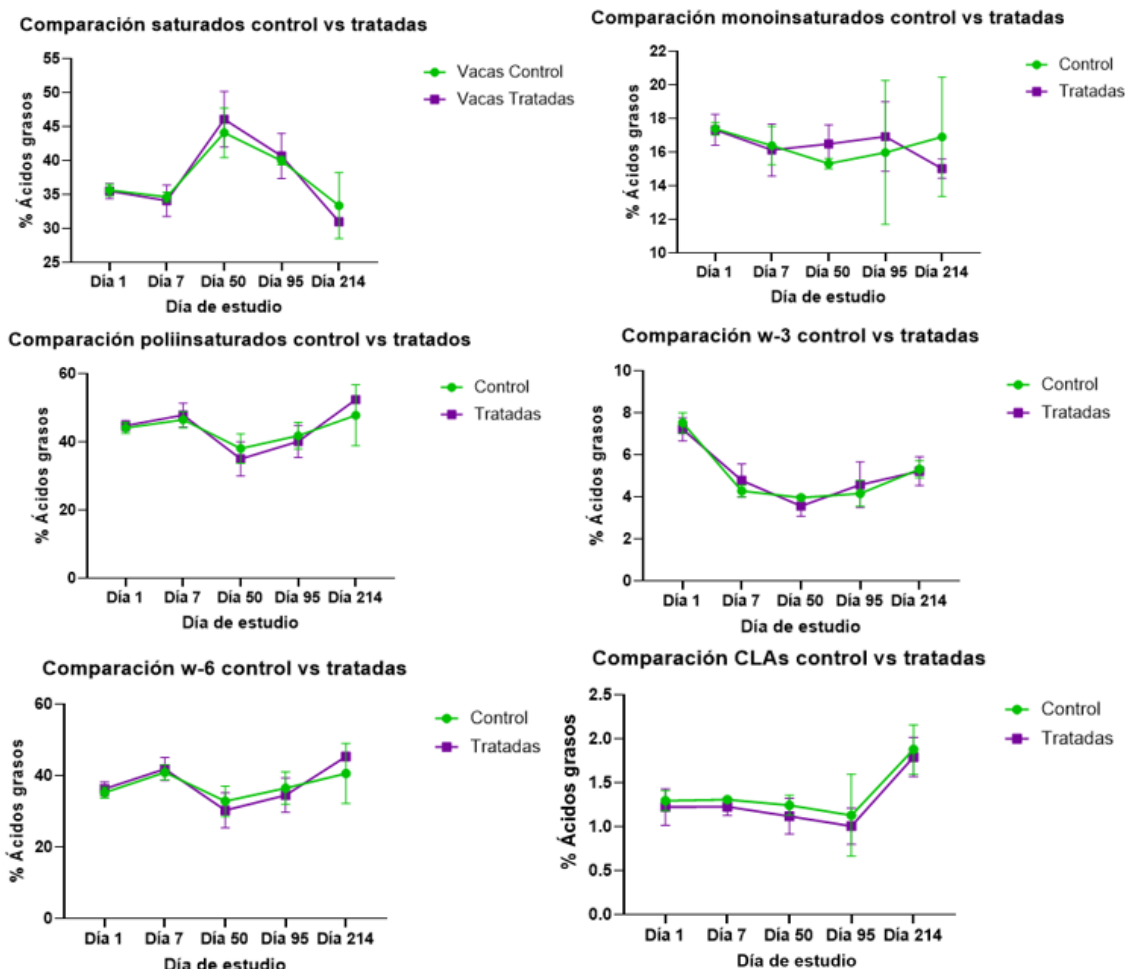


Figura 17: Comparación del porcentaje de los distintos ácidos grasos en la membrana de los eritrocitos entre las vacas control y las tratadas con somatotropina recombinante.

Simplemente, observando los gráficos de la Figura 17 se puede deducir que la influencia de la somatotropina no produce cambios en las membranas de las células sanguíneas de los animales. Las diferencias observadas entre las vacas control y las tratadas son mínimas, por lo que el principal factor de cambio en los ácidos grasos de las membranas de las células sanguíneas va a ser el tiempo, tal y como se aprecia en la Tabla 6.

Tabla 6: Comparación valores medios ácidos grasos de los eritrocitos de las vacas control y de las vacas tratadas con Lactotropina y significación de sus diferencias.

Tipo de ácido graso	Control		Tratadas rbST		Valores P		
	Media (%w/w)	SD	Media (%w/w)	SD	Tiempo	Tratamiento	Interacción
SFA	38.55	6.21	37.06	5.93	<0.0001***	0.93	0.58
MUFA	16.66	2.52	16.32	6.03	0.49	0.97	0.45
PUFA	40.65	8.18	43.47	6.14	<0.0001***	0.77	0.37
ω-3	4.55	1.54	4.89	6.25	<0.0001***	0.90	0.55
ω-6	34.52	7.45	37.14	6.34	<0.0001***	0.72	0.37
CLA	1.32	0.33	1.24	6.42	<0.0001***	0.15	0.99

Para asegurar que la información observada en los gráficos de la Figura 17 era estadísticamente correcta, se realizó un estudio ANOVA en dos direcciones para ver si en algún punto del estudio había diferencias significativas entre las vacas control y las vacas tratadas, y se estableció de forma estadística, que efectivamente, en las membranas eritrocitarias, los efectos de la somatotropina no influían en ninguno de los casos.

El mismo estudio realizado en los eritrocitos, se repitió para los linfocitos, con el mismo objetivo, ya que, al ser células diferentes, los patrones de cambio y la captación de lípidos es igual en los dos tipos celulares, y, aunque en los eritrocitos no se hubiese resultados positivos para la influencia de la somatotropina, podría haberlos en los linfocitos.

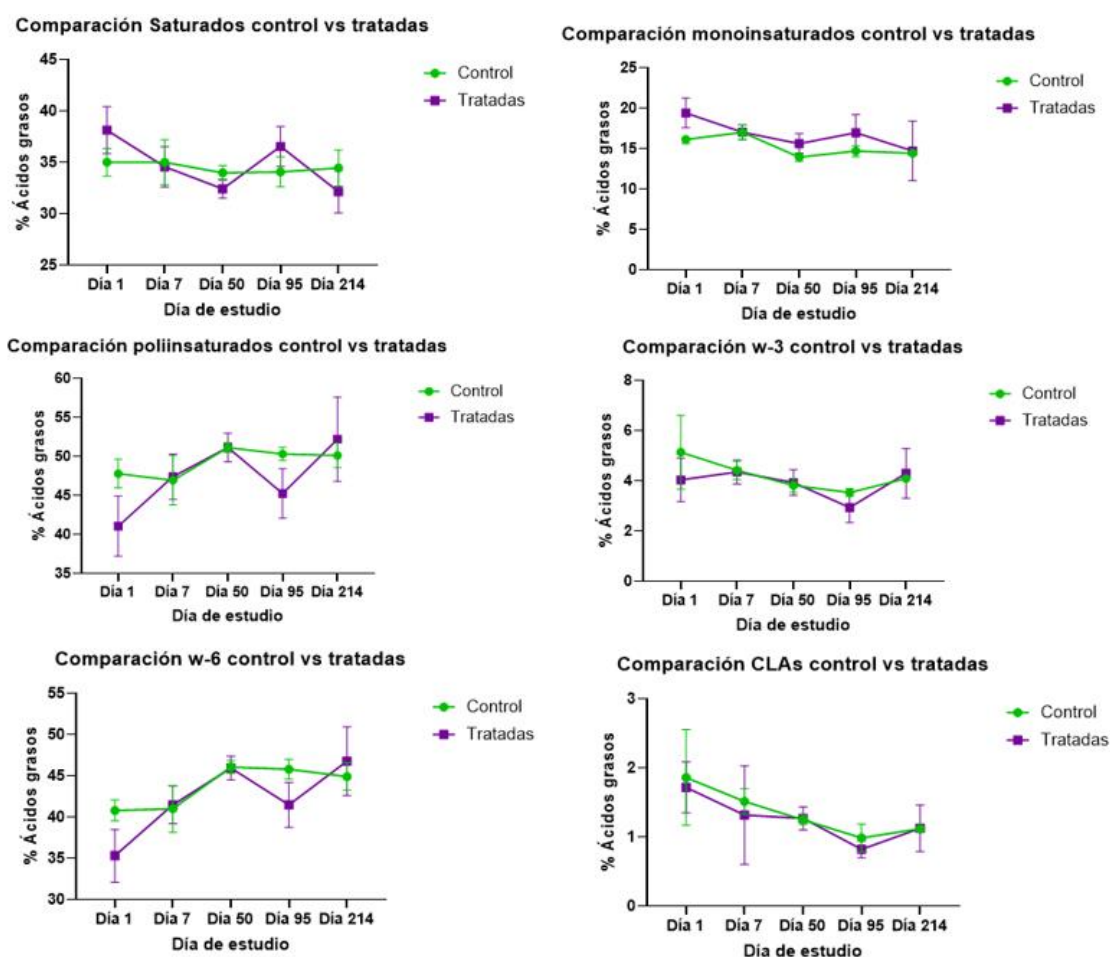


Figura 18: Comparación del porcentaje de los distintos ácidos grasos en la membrana de los linfocitos entre las vacas control y las tratadas con somatotropina recombinante.

En el caso de los linfocitos, simplemente observando los gráficos que se muestran en la Figura 18, se puede observar que las vacas tratadas sufren más fluctuaciones en función del tiempo que las vacas control, que de manera generalizada se mantienen más estables en cada uno de los ácidos grasos. Los ácidos grasos en los que se observan fluctuaciones diferentes entre las vacas tratadas con Lactotropina y aquellas

que se utilizan como control, son los ácidos grasos, saturados, los poliinsaturados y los ω -6. El resto de ácidos grasos varían de una manera muy similar, aunque no tan parecido como en el caso de los eritrocitos.

Tabla 7: Comparación valores medios ácidos grasos de linfocitos de las vacas control y de las vacas tratadas con Lactotropina y significación de sus diferencias.

Tipo de ácido graso	Control		Tratadas		Valores P		
	Media (%w/w)	SD	Media (%w/w)	SD	Tiempo	Tratamiento	Interacción
SFA	34.89	1.94	34.54	1.94	0.005**	0.68	0.03*
MUFA	15.32	1.94	16.54	1.29	0.01*	0.03*	0.49
PUFA	48.62	2.33	47.25	2.78	0.002**	0.11	0.07
ω-3	4.05	2.31	3.83	0.95	0.02*	0.26	0.40
ω-6	43.12	2.5	42.03	2.92	<0.0001****	0.10	0.06
CLA	1.29	2.4	1.23	0.46	0.003**	0.47	0.97

Aunque a simple vista en la Figura 18 se aprecian diferencias aparentemente grandes entre las vacas tratadas y las control en los SFA, los PUFA y los ω -6, el test ANOVA, representado en la Tabla 7, desveló que no había diferencia significativa causada por el tratamiento en ninguno de los tres casos, solo que en los ácidos grasos saturados influía significativamente ($p < 0.05$) la interacción de tiempo y tratamiento.

Otro dato relevante que develó el análisis ANOVA de los ácidos grasos monoinsaturados, es que, aunque aparentemente en el gráfico mostrado en la Figura 19 no se vea una diferencia evidente entre las vacas control y las tratadas, sí que hay una diferencia estadística entre ellas, puesto que el tratamiento sí que interviene en los cambios producidos en los ácidos grasos monoinsaturados de las membranas plasmáticas de los linfocitos, aunque esta diferencia significativa es menor ($p = 0.03$) que la diferencia significativa producida por el paso del tiempo ($p = 0.01$).

La principal conclusión que podemos sacar de estos análisis es que la somatotropina recombinante administrada de manera exógena no tiene influencia sobre la composición de la membrana de las células sanguíneas de las vacas, a pesar de tener influencia sobre el metabolismo lipídico del animal.

5. Conclusión

Las membranas de las células sanguíneas experimentan cambios en función del tiempo, como se ha comprobado a lo largo del estudio. Estos cambios son debidos a múltiples factores como pueden ser la lactancia, la temperatura externa, la influencia de las hormonas o la gestación.

En este estudio, el factor más relevante a la hora de producir cambios en las membranas de los eritrocitos en función del tiempo ha demostrado ser la temperatura ambiental. Debido al estrés oxidativo generado por el calor experimentado en la época estival, las vacas aumentan su porcentaje de ácidos grasos saturados en la membrana de los RBC, mientras que se observa un claro descenso de los ácidos grasos ω -6, lo que claramente afecta a la proporción de PUFA's en la membrana eritrocitaria. Los cambios experimentados en las membranas de las células de la línea roja no se han producido a una gran velocidad, puesto que siempre han ido de la mano con la estación del año (y la temperatura asociada a ella).

Estos cambios asociados a la gestación se relacionan con una concentración de SFA muy alta y una concentración de PUFA exageradamente baja, disminuyendo, sobre todo, su concentración de ω -3 y ω -6.

Por el contrario, no se ha observado un patrón de cambio claro en las células blancas, en comparación con los eritrocitos. Al hacer un estudio comparativo entre ambos tipos de células sanguíneas, se observó que los cambios producidos en las membranas de los linfocitos eran mucho menores, y, por tanto, que sus membranas eran más estables a lo largo del tiempo.

Finalmente, se comprobó que la potenciación de la lactación con somatotropina bovina recombinante no afecta a la composición grasa de las membranas de glóbulos rojos y blancos del ganado bovino de leche, a pesar de tener esta hormona un efecto demostrado sobre el metabolismo lipídico del animal.

6. Bibliografía

AEMET. Base de datos meteorológica. consulta datos diarios. <https://datosclima.es/Aemethistorico/Meteosingleday.php>

Aktas, M., Elmastas, M., Ozcicek, F., & Yilmaz, N. (2016). Erythrocyte Membrane Fatty Acid Composition in Premenopausal Patients with Iron Deficiency Anemia. *Journal of Oleo Science*, 65(3), 225–231. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15211>

Barreiro, R., Regal, P., López-Racamonde, O., Cepeda, A., & Fente, C. (2020). Evolution of breast milk fatty acids in Spanish mothers after one year of uninterrupted lactation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 159, 102141. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102141>

Body, D. R. (1988). The lipid composition of adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, 27(1), 39–60. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(88\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0163-7827(88)90004-5)

Calder, P. C., Yaqoob, P., Harvey, D. J., Watts, A., & Newsholme, E. A. (1994). Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochemical Journal*, 300(2), 509–518. <https://doi.org/10.1042/bj3000509>

Calder, P. C., Yaqoob, P., Thies, F., Wallace, F. A., & Miles, E. A. (2002). Fatty acids and lymphocyte functions. *British Journal of Nutrition*, 87(S1), S31–S48. <https://doi.org/10.1079/BJN2001455>

Chamorro López, L., Martínez González, J., García Cano, A. M., Busto Durán, R., Albillos Martínez, A., & Pastor Rojo, Ó. (2013). Análisis de la composición de ácido araquidónico y ácidos grasos omega-3 en plasma, membrana eritrocitaria y células inmunitarias de pacientes con cirrosis. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 6(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2012.05.004>

Chilton, B. S., & Hewetson, A. (2005). Prolactin and Growth Hormone Signaling (pp. 1–23). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)68001-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)68001-5)

De Carvalho CCCR, Caramujo MJ (2018). The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*, 23(10):2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>

Ferlazzo, A. M., Bruschetta, G., di Pietro, P., Medica, P., Notti, A., & Rotondo, E. (2011). Phospholipid composition of plasma and erythrocyte membranes in animal species by ³¹P NMR. *Veterinary Research Communications*, 35(8), 521–530. <https://doi.org/10.1007/s11259-011-9496-4>

Ferreri, C., Masi, A., Sansone, A., Giacometti, G., Larocca, A., Menounou, G., Scanferlato, R., Tortorella, S., Rota, D., Conti, M., Deplano, S., Louka, M., Maranini, A., Salati, A., Sunda, V., &

- Chatgililoglu, C. (2016). Fatty Acids in Membranes as Homeostatic, Metabolic and Nutritional Biomarkers: Recent Advancements in Analytics and Diagnostics. *Diagnostics*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010001>
- Ghebremeskel, K., Min, Y., Crawford, M. A., Nam, J., Kim, A., Koo, J., & Suzuki, H. (2000). Blood fatty acid composition of pregnant and nonpregnant Korean women: Red cells may act as a reservoir of arachidonic acid and docosahexaenoic acid for utilization by the developing fetus. *Lipids*, 35(5), 567–574. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-557-3>
- Joo, S. S., Lee, S. J., Park, D. S., Kim, D. H., Gu, B. H., Park, Y. J., Rim, C. Y., Kim, M., & Kim, E. T. (2021). Article changes in blood metabolites and immune cells in Holstein and Jersey dairy cows by heat stress. *Animals*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ani11040974>
- Lankinen, M., Uusitupa, M., & Schwab, U. (2018). Genes and Dietary Fatty Acids in Regulation of Fatty Acid Composition of Plasma and Erythrocyte Membranes. *Nutrients*, 10(11), 1785. <https://doi.org/10.3390/nu10111785>
- Luo Y, Kong Z, Yang B, He F, Huan C, Li J, Yi K. (2023). Relationship between Microflora Changes and Mammary Lipid Metabolism in Dairy Cows with Mastitis. *Animals*, 13(17):2773. <https://doi.org/10.3390/ani13172773>
- Matorras, R., Ruiz, J. I., Mendoza, R., Ruiz, N., Sanjurjo, P., & Rodriguez-Escudero, F. J. (1998). Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. *Human Reproduction*, 13(8), 2227–2230. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.8.2227>
- Mishra, S., Panda, M. S., & Chakraborty, H. (2023). Fusion peptide induced modification of membrane organization and dynamics: Implications in developing fusion inhibitors. *Chemical Physics Impact*, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2023.100287>
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Nguyen, T. D., Bordeau, B. M., Zhang, Y., Mattle, A. G., & Balthasar, J. P. (2022). Half-Life Extension and Biodistribution Modulation of Biotherapeutics via Red Blood Cell Hitch-Hiking with Novel Anti-Band 3 Single-Domain Antibodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 475. <https://doi.org/10.3390/ijms24010475>
- Nielsen, H. M., Friggens, N. C., Løvendahl, P., Jensen, J., & Ingvarsen, K. L. (2003). Influence of breed, parity, and stage of lactation on lactational performance and relationship between body fatness and live weight. *Livestock Production Science*, 79(2–3), 119–133. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00146-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00146-X)

- Novo, C., Fonseca, E., & Freitas, A. A. (1987). Altered fatty acid membrane composition modifies lymphocyte localization in vivo. *Cellular Immunology*, 106(2), 387–396. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(87\)90181-x](https://doi.org/10.1016/0008-8749(87)90181-x)
- Orakpoghenor, O., Avazi, D. O., Markus, T. P., & Olaolu, O. S. (2019). Lymphocytes: a brief review. *SCIRES Lit*, 3(1), 005-8. <https://www.sciresliterature.org/Immunology/SJII-ID17.pdf>
- Pearson, K. (1901). LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2(11), 559–572. <https://doi.org/10.1080/14786440109462720>
- Plasenzotti, R., Windberger, U., Ulberth, F., Osterode, W., & Losert, U. (2007). Influence of fatty acid composition in mammalian erythrocytes on cellular aggregation. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 37(3), 237-243. <https://doi.org/10.1007/s12013-007-9000-0> *Influence of fatty acid composition in mammalian erythrocytes on cellular aggregation - IOS Press*
- Poggi, P., Mirabella, R., Neri, S., Assirelli, E., Dolzani, P., Mariani, E., Calder, P. C., & Chatgililoglu, A. (2015). Membrane fatty acid heterogeneity of leukocyte classes is altered during in vitro cultivation but can be restored with ad-hoc lipid supplementation. *Lipids in Health and Disease*, 14(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0166-3>
- Pompéia, C., Lopes, L. R., Miyasaka, C. K., Procópio, J., Sannomiya, P., & Curi, R. (2000). Effect of fatty acids on leukocyte function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 1255-1268. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000001100001>
- Revskij, D., Haubold, S., Viergutz, T., Kröger-Koch, C., Tuchscherer, A., Kienberger, H., ... & Mielenz, M. (2019). Dietary fatty acids affect red blood cell membrane composition and red blood cell ATP release in dairy cows. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2769. <https://doi.org/10.3390/ijms20112769>
- Robert, C., Huet, A. C., Suárez-Pantaleón, C., Brasseur, A., Delahaut, P., & Gillard, N. (2017). Development of a confirmatory method for detecting recombinant bovine somatotropin in plasma by immunomagnetic precipitation followed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(11), 1925–1934. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1364429>
- Sanjulián, L., Lamas, A., Barreiro, R., Cepeda, A., Fente, C. A., & Regal, P. (2021). Bacterial Diversity of Breast Milk in Healthy Spanish Women: Evolution from Birth to Five Years Postpartum. *Nutrients*, 13(7), 2414. <https://doi.org/10.3390/nu13072414>
- Sardesai, V.M. (1992), The Essential Fatty Acids. *Nutrition in Clinical Practice*, 7: 179-186. <https://doi.org/10.1177/0115426592007004179>

Scott, J.L., McMillan, R., Marino, J. V. & Davidson G. (1973). Leukocyte labeling with 51chromium. IV. The kinetics of chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood*, 41 (1): 155-162. <https://doi.org/10.1182/blood.V41.1.155.155>

Silverthorn, D. U., (2019a). Anatomía del sistema inmunitario en Morando A. (Ed.) *Human physiology: an integrated approach* (8ª ed., pp. 757-760). Editorial Médica Panamá.

Silverthorn, D. U., (2019b). Compartimentación: células y tejidos en Morando A. (Ed.) *Human physiology: an integrated approach* (8ª ed., pp. 61-64). Editorial Médica Panamá.

Silverthorn, D. U., (2019c). La sangre en Morando A. (Ed.) *Human physiology: an integrated approach* (8ª ed., pp. 510-515). Editorial Médica Panamá.

Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B., & Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease-a review. part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 155(2). DOI: 10.5507/bp.2011.038 [Biomedical Papers: fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. part 1: classification, dietary sources and biological functions \(upol.cz\)](https://doi.org/10.5507/bp.2011.038)

Twisk, A. J. T., Detering, F., & Kraal, G. (1991). The Fatty Acid Composition of the Lymphocyte Cell Membrane. Influence on Interactions with High Endothelium and the Expression of Homing Receptors. *Immunobiology*, 183(5), 386–395. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80523-1](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80523-1)

UE, Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *DO L 276 de 20.10.2010*, p. 33/79 <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

Vance, D., & Vance, J. (1996). Physical properties and functional roles of lipids in membranes. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 31, 1-33. [Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes - Google Libros](https://books.google.com/books?id=...)

Veshkini, A., Gnott, M., Vogel, L., Kröger-Koch, C., Tuchscherer, A., Tröscher, A., Bernabucci, U., Trevisi, E., Starke, A., Mielenz, M., Bachmann, L., & Hammon, H. M. (2023). Abomasal infusion of essential fatty acids and conjugated linoleic acid during late pregnancy and early lactation affects immunohematological and oxidative stress markers in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 106(7), 5096–5114. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22514>

Weijers, R. N. M. (2015). Membrane flexibility, free fatty acids, and the onset of vascular and neurological lesions in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 15(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40200-016-0235-9>