

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria

Influencia del ciclo lunar sobre la expresión génica de las interleucinas 1, 6 y 8 en el bazo de cobayas (*Cavia porcellus*) en cuatro momentos del ciclo lunar

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario

Autores:

Karla Fernanda Guamán Matute

Paola Fernanda Pérez Navarro

Director:

Fernando Pedro Perea Ganchou

ORCID:  0000-0001-8301-6339

Cuenca, Ecuador

2024-08-05

Resumen

Se ha comprobado que el ciclo lunar influye en ciertos aspectos biológicos de los seres vivos. Es por ello, que, en el presente estudio se evaluó la influencia del ciclo lunar sobre la expresión génica de las Interleucinas (IL-1 β , 6 y 8). Se obtuvieron muestras de bazo de 80 cobayas en las fases de luna nueva, cuarto creciente, luna llena y cuarto menguante durante cuatro ciclos consecutivos. Los bazo fueron pesados en una balanza analítica y una muestra de tres de ellos usada para determinar la expresión de los genes antes mencionados. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza utilizándose el modelo lineal general; las medias se compararon con la prueba de los mínimos cuadrados. Se observó un efecto del ciclo lunar en el peso del bazo ($p = 0,0385$) y en el índice bazo somático ($p = 0,0332$). Este órgano fue significativamente más pesado en cuarto creciente que en las demás fases lunares. Por otra parte, se identificó el ARNm de las tres interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) en el bazo de estos animales. En ninguno de los casos se determinó aumento ni disminución en la expresión génica, o un patrón determinado en su expresión de acuerdo a las fases lunares. En conclusión, se observó un efecto del ciclo lunar en el peso del bazo e índice bazo somático, pero no en la apreciación cualitativa de la expresión de los genes de IL-1 β , IL-6 e IL-8.

Palabras clave del autor: gen, luna, inmunología



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The present study evaluated the influence of the lunar cycle on the gene expression of interleukins IL-1 β , IL-6 and IL-8. Spleen samples were obtained from 80 guinea pigs at the new moon, first quarter, full moon and third quarter during four consecutive cycles. The spleens were weighed on an analytical balance and a sample from three of them used to determine gene expression. Data were analyzed by analysis of variance using the general linear model; means were compared with the least squares test. An effect of the lunar cycle on spleen weight ($p = 0.0385$) and somatic spleen index ($p = 0.0332$) was observed. This organ was significantly heavier in the first quarter than in the other lunar phases. On the other hand, the mRNA of the three interleukins (IL-1 β , IL-6 and IL-8) was identified in the spleen of these animals. In neither case was an increase or decrease in gene expression determined, or a particular pattern in their expression according to the lunar phases. In conclusion, an effect of the lunar cycle on spleen weight and spleen somatic index was observed, but not on the qualitative assessment of IL-1 β , IL-6 and IL-8 gene expression.

Author keywords: gen, moon, immunology



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

1.	INTRODUCCIÓN	11
2.1	Objetivo general.....	13
2.2	Objetivos específicos	13
3.1	El cuy.....	14
3.2	Generalidades	14
3.3	Importancia del cuy.....	15
3.4	Sistema Inmunológico.....	16
3.4.1	Citoquinas.....	18
3.4.1.1	Interleucina 1.....	18
3.4.1.2	Interleucina 6.....	19
3.4.1.3	Interleucina 8.....	20
3.5	Melatonina	20
3.6	Influencia de la Melatonina en el sistema inmune	22
3.7	Relación de campo magnético con la glándula pineal.....	23
3.8	Influencia del ciclo lunar en la glándula pineal	24
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1	Ubicación del estudio.....	25
4.2	Animales.....	25
4.3	Manejo de animales en la granja	25
4.4	Manejo de animales y eutanasia.....	25
	Materiales	25
4.5	Grupos experimentales.....	26
4.6	Toma de muestras de tejido y procesamiento de tejido	27
	Materiales	27
	Procedimiento.....	27
4.7	Extracción del ARN.....	28
	Materiales biológicos	28
	Soluciones	28
	Materiales de laboratorio y equipos.....	28
	Proceso para la extracción de ARN en muestras de bazo de cobayas	28
4.8	Cuantificación del ARN	29
	Materiales biológicos	29
	Soluciones	29
	Materiales de laboratorio y equipos.....	29
	Proceso para la cuantificación de ARN.....	29
4.9	Síntesis del ADN complementario (cDNA)	29
	Materiales biológicos	29

Soluciones	29
Materiales de laboratorio y equipos.....	30
Proceso para la síntesis del ADN complementario (cDNA)	30
4.10 Amplificación del material genético	30
Materiales biológicos	30
Soluciones	30
Materiales de laboratorio y equipos.....	31
Procedimiento para la amplificación del ADN total de las muestras de bazo de cobayas	31
4.11 Detección de productos amplificados.....	32
Materiales biológicos	32
Materiales químicos y reactivos	32
Materiales de laboratorio y equipos.....	32
Proceso para la detección de productos amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
4.12 Variables de estudio	33
4.13 Análisis estadístico	34
5. <i>RESULTADOS</i>	34
6. <i>DISCUSIÓN</i>	37
7. <i>CONCLUSIONES</i>	40
8. <i>REFERENCIAS</i>	41
9. <i>ANEXOS</i>	46
Anexo 1. Clasificación de datos en los cuatro momentos del ciclo lunar en 4 ciclos consecutivos.....	46
Anexo 2. Clasificación de las muestras del bazo de cobayas según las fases del ciclo lunar	47
Anexo 3. Componentes para la síntesis del ADN complementario (cNDA).....	49
Anexo 4. Control/componentes para la síntesis del ADN complementario (cNDA)	50
Anexo 5. Manejo de animales y eutanasia	50
Anexo 6. Toma de muestras de tejido y procesamiento de tejido	50
Anexo 7. Extracción del ARN	51
Anexo 8. Cuantificación del ARN.....	52
Anexo 9. Síntesis del ADN complementario (cDNA).....	52
Anexo 10. Amplificación del material genético.....	52
Anexo 11. Detección de productos amplificados	53

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo lunar fraccionado en cuatro fases.27

Figura 2. Peso del bazo de cobayas nulíparas de acuerdo a la fase del ciclo lunar.34

Figura 3. Índice bazo somático $[(\text{peso del bazo}/\text{peso corporal}) \times 100]$ en cobayas nulíparas de acuerdo a la fase del ciclo lunar.35

Figura 4. Electroforesis de productos de PCR de GAPDH.36

Figura 5. Electroforesis de productos de PCR del gen de la IL-1 β .36

Figura 6. Electroforesis de productos de PCR del gen de la IL-6.37

Figura 7. Electroforesis de productos de PCR del gen de la IL-8.37

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía del cuy¹⁴

Tabla 2. Curva de temperatura de alineamiento³⁰

Tabla 3. Reactivos de premezcla para amplificación de material genético del bazo de cobayas³¹

Tabla 4. Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético del bazo de cobayas³²

Agradecimientos

En primer lugar, queremos expresar nuestro más sincero reconocimiento y gratitud a nuestro querido director de tesis Dr. Fernando Perea Ph.D. por su entrega, confianza y entusiasmo a lo largo de este trascurso de formación y trabajo de titulación, sus comentarios y sugerencias han sido fundamentales para culminar este trabajo. También, agradecemos al Dr. Antonio Vallecillo y a la Dr. Silvana Méndez por habernos guiado con paciencia y cariño compartiendo con nosotras su experiencia y sabiduría, recalando que cada uno de sus consejos y enseñanzas las llevaremos grabadas en nuestro corazón y mente a lo largo de nuestra trayectoria personal.

A nuestras familias, por su amor y apoyo incondicional, por creer en nosotras en todo momento, gracias a nuestros papás por enseñarnos el valor del esfuerzo y perseverancia.

A mis compañeros y amigos, por brindarnos momentos de alegría y distracción, necesarias para mantenernos pacientes y por siempre estar prestos a escucharnos.

A cada uno de los docentes que, de una u otra manera, contribuyeron tanto a nuestra formación académica, como personal. Agradecemos por todo su compromiso, paciencia y entrega, enseñándonos a ser buenas profesionales, que aman lo que hacen.

Fernanda & Paola

Dedicatoria

El presente trabajo de titulación se lo dedico principalmente a Dios, la Virgen y a mis padres, Maribel y Juan Carlos, que lucharon y se sacrificaron cada día para que nunca me falte nada, siempre buscando lo mejor para mí, es uno de los muchos logros que me quedan por cumplir y estoy segura que nunca lo hare sin su compañía.

A mis hermanos y a mi sobrina Ariana, los cuales fueron un pilar fundamental en mi formación personal, haciéndome cada día una mejor persona, llena de amor y apoyo, siendo ellos mi fuente de inspiración.

A mi familia, por siempre confiar en mí, por sus palabras de aliento, nunca dejando de brindarme su cariño, para que pueda terminar este paso tan importante en mi vida.

A mis dos ángeles que están en el cielo, sin ellos no hubiese logrado y conseguido lo que me he propuesto, me he convertido en la persona que soy ahora, por y gracias a ellos.

A Paola, mi compañera de tesis y de vida, quien me ha acompañado a lo largo de la carrera y la culminación de la misma, por ser esa amiga que siempre esta, pase lo que pase. Por todo su esfuerzo y determinación para que finalmente ese trabajo sea presentado.

Y a las personas con las que me encontré a lo largo de la carrera, por haberme ayudado en cada pequeño paso que di, y ser un apoyo absoluto en las dificultades que se han presentado.

Karla Fernanda Guamán Matute

Dedicatoria

Este trabajo de titulación se lo dedico en especial a Dios y a mi madre Delia por ser mi pilar y apoyo fundamental durante cada etapa de mi carrera profesional, por ser aquella voz de aliento e impulso, por su amor incondicional y sobre todo por creer en mí y en mis capacidades incluso cuando yo no lo hacía.

A mis hermanos Laura, Cecilia, Jorge y John por brindarme sus palabras de consuelo y orientación que me alentaban a seguir día a día.

A mis cuñados María Fernanda, Diego y Aníbal que siempre me brindaron una mano amiga, y a mis pequeños sobrinos Santiago, Josué, Andrés, Estefany y Sebastián.

A mi querida amiga y compañera de tesis Fernanda por compartir conmigo cada risa y lagrima durante nuestra carrera, por su dedicación y esfuerzo que nos permitió culminar con éxito nuestro trabajo de titulación.

A mis amigas Daysi, Tatiana y Ximena por brindarme su afecto y convertirse en unas de las amistades más sinceras que la vida me pudo entregar.

Por último, a mis adoradas y amadas mascotas.

Paola Fernanda Pérez Navarro

1. Introducción

El sistema inmune innato comprende órganos, tejidos, células y moléculas que interactúan para generar respuestas específicas ante agentes infecciosos, antígenos extraños o propios del organismo (Mage, 2005). El bazo es uno de los órganos linfoides responsable de iniciar reacciones inmunitarias frente a los antígenos presentes en la sangre (Cesta, 2006). Los genes asociados con el sistema inmune y las proteínas que ellos codifican, son sumamente necesarios para el desarrollo y el funcionamiento adecuado del sistema inmunitario (Mage, 2005).

La Melatonina es una hormona producida por la glándula pineal de los mamíferos, que es sintetizada en la noche a partir del Triptófano, para luego ser liberada a la circulación y, de este modo, alcanzar los tejidos diana (Carrillo et al., 2013; Arias et al., 2023). La Melatonina desempeña un papel importante en la modulación del sistema inmune, regulando el desarrollo, la diferenciación y la función de los tejidos linfoides (Herman et al., 2016). Esta hormona es capaz de afectar tanto la inmunidad humoral como la celular. Esta última, estimula la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II aumenta la respuesta de los antígenos por macrófagos esplénicos e incrementa la producción de citocinas tales como la Interleucina (IL) 2, IL-6, IL-12 e Interferón gamma (Matheus et al., 2012). En el caso de la respuesta humoral, contribuye a estimular la producción de las células NK (Asesinas naturales), activa los monocitos lo que conlleva a la producción de la IL-1 (Matheus et al., 2012). Las interacciones entre el sistema inmunitario y la glándula pineal parecen ser bidireccionales (Herman et al., 2016).

Se demostró que la actividad eléctrica de una población importante de células de la glándula pineal puede verse afectada por los cambios en el campo electromagnético de la tierra (Reuss & Vollrath, 1983). De igual modo, se observó que en ratas, las variaciones de estos campos magnéticos fueron capaces de influir directamente en la glándula pineal con efectos sobre la actividad de la Serotonina – N – acetiltransferasa, las concentraciones séricas de Melatonina y el contenido pineal de Melatonina (Welker et al., 1983).

Solamente tres estudios han relacionado las fases del ciclo lunar con cambios funcionales y estructurales en la glándula pineal (Martínez-Soriano et al., 2002a; Martínez-Soriano et al., 2002b; Geramisov et al., 2014). Se estudió la influencia de la luz-oscuridad, estaciones del año y ciclos lunares en el número de cuerpos sinápticos de la glándula pineal de la rata (Martínez-Soriano et al., 2002). Estas estructuras están presentes en los

pinealocitos y están relacionadas con la producción y la regulación de la Melatonina (Martinez-Soriano et al., 1984). Dichos autores demostraron que tanto el número de cuerpos sinápticos, así como la concentración sérica de Melatonina en el suero, tenían valores mayores durante luna llena (Martínez-Soriano et al., 2002). En otro análisis se investigó la manifestación de cambios morfológicos dependientes de la fase lunar en ratones, y se observó un incremento en el número de vesículas secretoras granulares y una distribución desigual en los diferentes tipos de células, cambios que igualmente se presentaron durante la luna llena (Geramisov et al., 2014).

Los estudios antes mencionados muestran la influencia de las fases del ciclo lunar sobre la capacidad funcional de la glándula pineal, que como se indicó anteriormente, desempeña un papel primordial sobre el sistema inmunológico. Podría esperarse que, como el ciclo lunar influencia la secreción de Melatonina por parte de la glándula pineal, el sistema inmune podría ser modulado por las fases lunares, como ocurre con otras funciones biológicas (El-Darawany et al., 2021; Dergaa et al., 2021; Chowdhury et al., 2020). En la actualidad se desconoce si algunos marcadores inflamatorios son influenciados por el ciclo de la luna. De demostrarse un vínculo entre el ciclo lunar y el sistema inmune se podría evaluar su efecto ante desafíos vacunales, y así comprender mejor la magnitud de su influencia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar en las células del bazo de cobayas la expresión génica de las Interleucinas 1, 6 y 8 en cuatro momentos del ciclo lunar.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar la expresión génica de las Interleucinas 1, 6 y 8 en el bazo de cobayas en cuatro momentos del ciclo lunar.
- Evaluar si el bazo varía su peso en los cuatro momentos del ciclo lunar.

3. Revisión de literatura

3.1 El cuy

El cuy (*Cavia porcellus*) o cobayo conocido comúnmente, es un roedor histricomorfo herbívoro, crepuscular, no excavador (Hargaden & Singer, 2012), perteneciente a la familia Caviidae (Tabla 1). Se encuentran en las zonas montañosas de la cordillera de los Andes en América del Sur, siendo Ecuador el segundo país con más población de estos animales, teniendo aproximadamente más de 10 millones de cobayos en su región (Pritt, 2012).

Tabla 1. Taxonomía del cuy

Reino	Animal
Filo	Cordados
Clase	Mamíferos
Subclase	Theria
Orden	Rodentia
Suborden	Hystricomorpha
Familia	Caviidae
Subfamilia	Caviinae
Género	Cavia
Especie	<i>Cavia porcellus</i>

(Pritt, 2012; Mendoza, 2015)

3.2 Generalidades

Este animal posee un cuerpo ancho con una forma alargada, su tamaño varía entre los 20 a 30 cm de longitud (Mendoza, 2015). Su cabeza y orejas son pequeñas, mientras que sus ojos son medianos y vivaces y sus extremidades cortas, con 4 dedos en los miembros anteriores y 3 dedos en los miembros posteriores, constando de unas garras un tanto afiladas en estos (Mendoza, 2015). Este roedor tiene una ausencia de cola (Hargaden & Singer, 2012) y a diferencia de otros roedores, el cuy tiene una vista bien desarrollada y en color, sin embargo, debido a la posición de sus ojos se le dificulta medir las distancias (Mendoza, 2015). Poseen un peso de entre 700 a 1.200 gramos, siendo la hembra más pequeña que el macho, exceptuando en la gestación (Hargaden & Singer, 2012). Estos animales llegan a vivir

aproximadamente hasta los 8 años, aunque su vida productiva es de 18 meses (Hargaden & Singer, 2012; Mendoza, 2015).

Los cobayos tienen hábitos alimenticios diurnos y nocturnos, lo cual es ventajoso para que dispongan de un rápido crecimiento hasta alcanzar el tamaño adulto (Aucapiña & Marín, 2016). La alimentación se basa principalmente en forraje verde, aunque en los sistemas de producción comercial se ha incorporado el uso de concentrado para completar su ración alimenticia, acelerando así su crecimiento (Aucapiña & Marín, 2016).

Existen diferentes tipos de cuyes, distinguiéndose por su tamaño; color de ojos; forma y coloración del pelaje, entre ellos, blanco, negro, ámbar, gris, o una combinación de estos; y número de dedos (Mendoza, 2015). También se les identifica por los nombres de las ciudades, regiones y países de origen, dando así, lugar a innumerables tipos (Mendoza, 2015).

3.3 Importancia del cuy

El cuy es un mamífero roedor caracterizado por su gran precocidad y prolificidad, incluso podemos señalar que este animal se caracteriza por la excelente calidad de su carne, por lo que en la actualidad la misma es considerada como una fuente de proteína ideal dentro del consumo interno (Cantaro et al., 2021). La carne del cuy se distingue por ser magra, con un porcentaje de grasa menor al 10 %, alto contenido de proteínas, mínimo porcentaje de Colesterol y Sodio por lo que es perfecta para ser incorporada dentro de la alimentación diaria de una gran variedad de grupos poblacionales (Estrada et al., 2021).

Dicha carne es consumida en varios países, ya que se caracteriza por su alto valor nutricional y su gran digestibilidad, por lo que es considerada un alimento beneficioso para la salud humana, ya que su consumo ofrece el aporte de proteína, Hierro, y Vitamina B (Flores et al., 2017). La ONU y la FAO le han denominado a esta especie como fuente de seguridad alimentaria de la población mundial de bajos recursos (Cantaro et al., 2021). Por este motivo la crianza de este animal ha venido desempeñándose de manera intensiva, ya que se considera una actividad pecuaria económicamente rentable asociada con la calidad y demanda de la carne de cuy relacionada con la facilidad de manejo, la gran capacidad de adaptación, además esta actividad pecuaria se caracteriza por la baja exigencia de recursos (Cantaro et al., 2021).

Por otro lado, los cobayos han sido utilizados como modelos experimentales aproximadamente por 200 años, siendo el primer animal utilizado como base investigativa para tratar enfermedades como la Tuberculosis y la Difteria en los siglos XIX y XX (Taylor & Lee, 2012). A partir de ese momento, el conejillo de Indias ha sido empleado para el estudio de enfermedades humanas, entre las que se incluyen las enfermedades pulmonares, sexuales, oculares, auditivas, gastrointestinales; entre otras. La respuesta fisiopatológica e inmune de los cobayos frente a estas enfermedades guardan especial similitud con las infecciones humanas, además sus respuestas hormonales e inmunológicas (timo, médula ósea, inmunidad innata, sistema de complemento) fisiología pulmonar, respuesta a corticoesteroides, mecanismos de hipersensibilidad guardan una gran semejanza con la dinámica fisiológica del ser humano lo que ha contribuido con el desarrollo de posibles terapias y vacunas (Padilla et al., 2008).

3.4 Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico desempeña un papel sumamente importante en la protección del organismo (Lin & Buffenstein, 2021), y actúa a través de una red de interacciones complejas, las cuales funcionan de manera coordinada, siendo intervenidas por numerosas células, proteínas y moléculas para defender al organismo contra agentes extraños que puedan penetrar el mismo, el desarrollo de enfermedades inflamatorias, el mantenimiento la homeostasis en los tejidos, entre otros (Carrillo et al., 2013; Lin & Buffenstein, 2021).

Los tejidos y órganos que componen al sistema inmunológico incluyen la médula ósea, el bazo, el timo, el sistema circulatorio, el tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) y el sistema linfático. Estos se dividen como órganos primarios y secundarios, además de las células que estructuran este sistema, donde se encuentran células inmunes mieloides, células inmuno linfoides, linfocitos de células B, linfocitos de células T, macrófagos, neutrófilos, células efectoras y células reguladoras, entre otras, todas ellas proporcionando defensa al organismo del animal (Moini et al., 2020).

La médula ósea y el timo son considerados como órganos linfoides primarios, debido a que son lugares de origen de la hematopoyesis y desarrollo de linfocitos B y T (Whary et al., 2015). En cuanto a los ganglios linfáticos, las tonsilas, el bazo y las placas de Peyer, constituyen tejidos linfoides secundarios, en donde se da el inicio de la respuesta inmunitaria (Whary et al., 2015). Generalmente, los ganglios linfáticos y el bazo se analizan con frecuencia en estudios de respuesta inmunitaria y como órganos para el aislamiento de células inmunitarias (Whary et al., 2015).

Los órganos linfoides terciarios han sido descritos generalmente como todos los órganos y tejidos del organismo que se ven afectados por situaciones inflamatorias crónicas, en el cual se observan agregados de células inmunitarias, ya sea en el tracto gastrointestinal o respiratorio, denominado como “tejido linfoide asociado al intestino” (GALT), que se encuentra dentro del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT); y los tejidos asociados a los bronquios (BALT) (Cabrerizo & Loja, 2017; Whary et al., 2015).

La respuesta inmunitaria es el resultado de dos tipos principales de inmunidad, la respuesta innata o inespecífica y la respuesta adquirida o específica (Carrillo et al., 2013).

La primera incluye mecanismos de defensa, que están presentes antes que se produzca la infección, facilitando así una respuesta rápida (Carrillo et al., 2013). Estos mecanismos responden con la misma intensidad con la que los patógenos atacan, mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como el lipopolisacárido, la flagelina bacteriana, el ARN de cadena simple (s) y doble (ds) y el ADN no metilado, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) extra o intracelulares (Carrillo et al., 2013; Whary et al., 2015).

Los principales componentes que se encuentran en este tipo de respuesta son los macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, granulocitos, células dendríticas y poblaciones de linfocitos de tipo innato (ILC) 1, 2 y 3, donde incluye las células asesinas naturales (NK), estas células se activan en respuesta a citocinas y a través de receptores de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP) localizadas principalmente en las mucosas (Carrillo et al., 2013; Ruiz et al., 2017). Además de los diversos factores solubles, tales como las citoquinas, en donde se encuentran, el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Carrillo et al., 2013).

Por otro lado, la inmunidad adquirida tiene una magnitud de respuesta alta, las cuales aumentan con las exposiciones sucesivas a un microorganismo específico. Los componentes de esta respuesta son los linfocitos T y B, además de las proteínas circulantes como anticuerpos y citoquinas (Carrillo et al., 2013). Consta de un componente humoral y otro celular (Carrillo et al., 2013).

Los anticuerpos corresponden a las moléculas efectoras de la respuesta inmune humoral que reconocen y se unen a patógenos extracelulares o moleculares no propios. En caso de la respuesta inmune celular, actúa sobre los microorganismos intracelulares y se encuentra

mediada por los linfocitos citotóxicos (CD8+), los cuales son encargados de reconocer y destruir las células infectadas. También se conoce de los linfocitos T auxiliares (Th; CD4+), que actúan como elementos clave en la regulación y coordinación del desarrollo de las respuestas inmunes humoral y celular mediante la producción de una gran variedad de citoquinas (Carrillo et al., 2013).

3.4.1 Citoquinas

Las citoquinas son moléculas de señalización secretadas que intervienen en la comunicación célula-célula en un sistema biológico complejo (Whary et al., 2015). Comúnmente distintos tipos de células secretan la misma citoquina o una sola citoquina actúa sobre varios tipos de células diferentes. Estas son redundantes en su actividad, lo que quiere decir que pueden estimular funciones similares y, además, pueden actuar de forma sinérgica o antagónica (Zhang & An, 2007).

Las citoquinas estimulan a sus células diana para que produzcan citoquinas adicionales, ocasionando así que se origine una red de las mismas (Zhang & An, 2007). Incluye a la gran familia de las interleucinas (IL-1 a IL-37), factores de necrosis tumoral (TNFs), interferones (tipo I, II, III) y factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de granulocitos - macrófagos (GM-CSF) y el factor de células madre (SCF) (Whary, 2015). La secreción de citoquinas suele producirse en respuesta al reconocimiento del antígeno a través del receptor de reconocimiento de patrones (PRR) o del receptor de células T (TCR) (Whary et al., 2015).

Existe un subgrupo particular de citoquinas estructuralmente relacionadas que actúan dentro de la respuesta inmunitaria, se conocen como quimioquinas, que son pequeñas moléculas que funcionan principalmente en la activación y migración de leucocitos, regulando el tráfico celular hacia los lugares de encuentro con el agente y facilitando el contacto célula-célula actuando como quimio atrayentes, aunque algunos de ellos poseen una variedad de funciones diferentes (Whary, 2015; Zhang & An, 2007). Las quimioquinas se agrupan según el número de Cisteínas y enlaces disulfuro de la molécula en: C-X-X; C-C; C; y CX₃CI (Whary et al., 2015).

3.4.1.1 Interleucina 1

Es una citoquina central que está presente en la inmunidad innata y la inflamación, cumple un papel de mediador patógeno en enfermedades autoinflamatorias, autoinmunes, infecciosas y degenerativas (Garlanda et al., 2013). La IL-1 consta de moléculas con actividad

agonista (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36a, IL-36b e IL-36g); antagonistas del receptor de IL-1 (IL-1Ra, IL-36Ra e IL-38) y una citoquina antiinflamatoria (IL-37) (Garlanda et al., 2013).

La IL-1 posee varias funciones, prolonga la vida útil y estimula la función efectora de neutrófilos y macrófagos, además, es la encargada de la diferenciación y función de las células linfoides innatas y adaptativas, estimula los fibroblastos, el catabolismo óseo y los efectos neuroendocrinos (Garlanda et al., 2013; Whary et al., 2015). La IL-1 α y la IL-1 β se unen al mismo receptor (IL-1R1), tienen propiedades biológicas similares, sin embargo, están codificadas por distintos genes, existiendo algunas diferencias que influyen en la inmunidad y la inflamación (Garlanda et al., 2013).

El precursor de la IL-1 α está presente en las capas epiteliales de todo el tracto gastrointestinal, pulmón, hígado, riñón, células endoteliales y astrocitos. Es totalmente activo y funciona como una “alarma”, debido a que inicia rápidamente una cascada de citocinas y quimiocinas inflamatorias (Garlanda et al., 2013).

La IL-1 β es producida por células hematopoyéticas, como los monocitos sanguíneos, los macrófagos tisulares, las células dendríticas de la piel y la microglía cerebral. El precursor de este tipo de interleucina, no es activo, sino que es separado por la caspasa-1, provocando que se libere citocina activa al espacio extracelular (Garlanda et al., 2013).

3.4.1.2 Interleucina 6

La IL-6 es una citocina pleiotrópica o multifuncional, la cual es capaz de producir una respuesta a infecciones y daños tisulares, junto con la IL-1 y TNF- α son consideradas las citocinas más importantes durante un proceso inflamatorio (Matsuda & Kishimoto, 1998; Velázquez et al., 2019). Esta interleucina está asociada con efectos proinflamatorios y antiinflamatorios, actuando de forma fundamental en la activación y regulación de la respuesta inmune (Velázquez et al., 2019).

Es producida por varias células, entre ellas los fibroblastos, queratinocitos, células mesangiales, endoteliales vasculares, dendríticas, mastocitos, macrófagos y las células T y B, actuando sobre las mismas y sobre las células madre hematopoyéticas y los hepatocitos, induciendo la hematopoyesis en reacciones de fase aguda (Matsuda & Kishimoto, 1998; Velázquez et al., 2019).

Las actividades biológicas afectadas por la producción de IL-6 incluyen: el control de la diferenciación de monocitos en macrófagos mediante la regulación de la expresión del factor estimulante de colonias de macrófagos; el aumento de la producción de IgG de células B mediante la regulación de la expresión de IL-6 - IL-21; la regulación negativa de la maduración de las células dendríticas mediante la activación de la vía de señalización STATE (Velázquez et al., 2019).

3.4.1.3 Interleucina 8

La IL-8 es una citocina quimiotáctica activadora de los neutrófilos, es producida por células musculares lisas, células endoteliales, células epiteliales, monocitos, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y células T (Whary et al., 2015; Apostolopoulos et al., 1996). Es la encargada de inducir la migración de células a un sitio de inflamación, se secreta activamente en el espacio extracelular tras la estimulación de células inflamatorias, debido a que actúa como un atrayente para neutrófilos, linfocitos y basófilos, y puede contribuir al reclutamiento de las mismas. (Remick, 2005; Apostolopoulos et al., 1996).

Varios estímulos inducen la secreción de IL-8, incluidos los lipopolisacáridos, bacterias, y otras citoquinas proinflamatorias tempranas (Factor de necrosis tumoral y la IL-1) (Remick, 2005). La IL-8 relativamente es única, ya que puede producirse en una fase temprana de la respuesta inflamatoria y persistirá durante un tiempo prolongado, diferenciándose con la mayoría de citocinas inflamatorias, las cuales normalmente se producen y eliminan en pocas horas (Remick, 2005).

3.5 Melatonina

Es una hormona identificada como N-acetyl-5-metoxytryptamina, del grupo de las indolaminas, y está formada por un grupo amino/indol y un hidrocarburo. Esta hormona pertenece a la familia de los metoxiindoles, que son sintetizados a partir del Triptófano. Es conocida debido a la influencia que tiene sobre el ritmo circadiano, aunque en la actualidad se ha demostrado que desempeña una amplia variedad de funciones en la regulación fisiológica del organismo (Cipolla & Amaral, 2018).

La Melatonina es sintetizada y secretada por la glándula pineal, la cual se caracteriza por ser un órgano impar y esférico; ubicado en el centro del cerebro, por encima del techo del tercer ventrículo, y es conocida como el principal sitio de síntesis de la Melatonina (Vainer et al., 2021). Esta hormona es secretada en respuesta a diversos cambios diarios estacionales del

ciclo ambiental luz-oscuridad, señales que son captadas por las células ganglionares ubicadas en la retina y enviadas al núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, el cual es considerado como un reloj biológico interno (Westreicher et al., 2022).

La información recolectada por el NSQ es llevada hacia el núcleo hipotalámico paraventricular, el cual cuenta con terminaciones nerviosas que se extiendan a la médula espinal, hacia el primer segmento torácico y al ganglio cervical superior, lugar desde donde la neurona simpática postganglionar que inerva a la glándula pineal provoca la liberación de norepinefrina que interacciona con los receptores alfa y beta de los pinealocitos y contribuyen al aumento de la actividad de la adenilciclase, enzima que favorece el comienzo de la síntesis de Melatonina (Alonso, 2020).

La Melatonina únicamente se secreta durante la noche, asociada de cierta manera a la oscuridad, debido a que las neuronas del núcleo supraquiasmático son más eléctricamente activas en el día, ya que liberan el neurotransmisor GABA que inhibe la vía de secreción de Melatonina, de este modo al haber menor actividad eléctrica en la etapa nocturna se favorece la liberación de dicha hormona (Vainer et al., 2021).

Como se mencionó anteriormente, esta hormona es sintetizada a partir de un aminoácido conocido como Triptófano que es captado del torrente circulatorio, este sufre una primera hidroxilación y se transforma en 55-hidroxitriptofano, y posteriormente se descarboxila en Serotonina (Pévet, 2002). A partir de este punto interviene la Noradrenalina que desencadena una reacción en cascada provocando el aumento de la enzima Serotonina N-acetil-transferasa que mediante una acetilación obtiene N-acetil-Serotonina, que como último paso se oxi-metila en N-acetil-5-metoxitriptamina, más conocida como Melatonina (Argüelles & Bonmatí, 2015).

El control noradrenérgico sobre la glándula pineal es esencial para la síntesis y secreción de esta hormona es liberada al sistema vascular en donde es capaz de atravesar las membranas y barreras, logrando ingresar al interior de los orgánulos células, la Melatonina se metaboliza rápidamente en el hígado y se elimina por la orina (Argüelles & Bonmatí, 2015).

Sin embargo, la Melatonina puede ser producida en otros tejidos, entre los que se encuentran la retina, médula, intestino, piel, hígado, riñones, ovarios, placenta y cerebro. Estos son conocidos como tejidos extrapineales, en los que esta hormona cumple la función de antioxidante o factor tisular, razón por la que en los mamíferos para señalizar el ciclo luz-oscuridad se utiliza únicamente la Melatonina proveniente de la glándula pineal (Argüelles & Bonmatí, 2015).

Haciendo referencia al mecanismo de acción de la Melatonina podemos nombrar su capacidad a unirse a los receptores MT1, MT2 (Acoplando a la proteína G de membrana) y MT3, este último sólo es encontrado en hámsters. Los MT1 y MT2 están ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central y también por el sistema nervioso periférico (Correa et al., 2017).

El MT1 es el principal receptor que desencadena la respuesta inmunitaria adquirida, además se expresa en la retina, órganos sexuales, vesícula biliar, hígado, riñón, células inmunitarias, y el sistema cardiovascular. El MT2 tiene un efecto sobre la amplitud de los ritmos circadianos y en la regulación de respuestas inflamatorias y se relaciona con la respuesta inmunitaria innata, y se expresa en el hipotálamo, sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, la piel y el tejido adiposo. Con respecto al MT3 lo único que se conoce hasta la actualidad es que juega un papel estimulante en la renovación del Fosfatidilinositol (Argüelles & Bonmatí, 2015) (Correa, 2021).

3.6 Influencia de la Melatonina en el sistema inmune

La Melatonina desempeña un sinnúmero de funciones; sin embargo, nos centraremos únicamente en el papel que juega dentro del sistema inmunológico con el que mantiene una relación intrínseca, ya que es capaz de regular las respuestas inmunitarias porque es capaz de inactivar procesos inflamatorios, incluso puede controlar la proliferación y la actividad de las células inmunocompetentes (Correa, 2021).

La influencia de esta hormona sobre el sistema inmune está mediada por las células T las que son encargadas de proteger a los mamíferos de múltiples infecciones, cánceres y enfermedades autoinmunes; asimismo ejerce un papel primordial en el desarrollo, diferenciación, activación, y memoria de las células T ubicadas en el timo (Correa, 2021).

Esta capacidad de desempeñar funciones en la inmunidad de los organismos se debe a los receptores de Melatonina acoplados a la proteína G que están localizados en las células inmunocompetentes, de igual modo dicho autor describe la acción de un eje inmunopineal que es capaz de transmitir información de la fase oscura hacia el sistema inmunitario dicha señal provoca una disminución en la migración de linfocitos T y leucocitos (Correa, 2021).

A su vez, esto genera la liberación de IL-12 a partir de los monocitos que favorecen la reactivación y diferenciación de los linfocitos T heper 1, por lo que la Melatonina induce de cierto modo a la liberación de IL-2 e Interferón- γ y encargado de la protección del organismo frente a la presencia de microorganismos intracelulares. También se ha sugerido que la

respuesta inmune de la Melatonina se debe a que los péptidos opioides generan un efecto que actúa como mediador de dicha reacción (Valdés, 2003).

La Melatonina incrementa de manera significativa las funciones del sistema inmunitario in vivo, favoreciendo la proliferación linfocitaria esto debido a que se unen a los receptores que se encuentran en los esplenocitos, incrementando su capacidad de proliferación, este proceso a su vez es capaz de activar la acción de las células y por ende estas producen IL-2 e IL-1 β lo que contribuye a un incremento en la inmunidad celular (Arias et al., 2003).

Esteban et al. (2013), en su investigación acerca de la influencia de la Melatonina en el sistema inmune de ratas menciona que esta hormona, además de aumentar la actividad de los leucocitos, es capaz de estimular niveles más altos de IL-2, IL-3, IL-6, Interferón-gamma, factor de necrosis tumoral- α , factor estimulante de macrófagos, factor tisular y el sistema opioide.

Vinther et al., (2015), en su investigación acerca de la influencia de la Melatonina en el sistema inmune menciona que esta hormona aumenta de cierto modo la producción de péptidos provenientes del timo entre ellos la Timosina-1alfa y la Tiamulina, todo esto debido a que de igual modo provoca el incremento en la expresión del gen de la Protimosina-alfa, este gen a su vez colabora en el mejoramiento de la inmunidad innata, la cual como es de conocimiento es mediado por la actividad de las células T y su diferenciación.

3.7 Relación de campo magnético con la glándula pineal

El campo magnético de la tierra es un campo físico que posee una fuerza impresionantemente fiable y ubicua. Los organismos capaces de percibir la dirección, polaridad y densidad de este campo, así como las variaciones a las que puede llegar a someterse él mismo, son capaces no sólo de determinar la ubicación geográfica, sino también de adquirir información circadiana, lunar y circalunar que contribuiría a la sincronización de sus ciclos biológicos (Olcese et al., 1988).

Se demostró que las variaciones en el campo electromagnético terrestre influyen de manera directa en la formación de Melatonina pineal, además se comprobó que una estimulación magnética baja, similar a la del campo geomagnético de la tierra, provoca la disminución de la actividad secretora de la Melatonina, ya que la concentración de las enzimas Hidroxi-O-metiltransferasa y la N- acetiltransferasa que intervienen en la biosíntesis de Melatonina en la glándula pineal se reduce considerablemente, por lo que dichos autores denominan a estos

campos como sincronizadores externos de los ritmos pineales (Welker, 1983; Reuss & Vollrath, 1983; Cremer-Bartels et al, 1984).

En años posteriores se continúa investigando acerca de los efectos de los campos magnéticos utilizando como individuos experimentales a ratas pigmentadas en los que se descubre la relación que mantiene el ritmo circadiano y los campos magnéticos (Olcese, 1990). Esto significa que los cambios del campo electromagnético del planeta podrían causar variación en el patrón de secreción de Melatonina y, por lo tanto, modificar el comportamiento fisiológicos de los tejidos periféricos en los cuales esta hormona ejerce una función.

Reither (1992), describe que la síntesis y secreción de Melatonina por la glándula pineal comunica sobre los cambios temporales o anuales en el organismo. En los mamíferos la secreción de Melatonina es baja durante el día y alta durante la noche, y es sincronizada por los ciclos de luz-oscuridad, información que se obtiene por las células ganglionares ubicadas en la retina razón por la que las respuestas de la glándula pineal a los cambios en el campo magnético varían a lo largo del fotoperiodo.

3.8 Influencia del ciclo lunar en la glándula pineal

El movimiento de la luna en su órbita provoca cambios constantes no solo en la luminosidad nocturna, sino también ejerce una acción en el campo geomagnético, en la atracción gravitatoria y en la amplitud de las mareas, factores que influyen en los aspectos biológicos de los seres vivos (Bevington, 2015).

La intensidad de la luz de la luna en conjunto con el campo magnético varía estimulando la formación de picos en torno a la luna llena y el cuarto de luna, en cuanto a los picos de atracción gravitatoria y amplitud de las mareas ocurren en la luna nueva y luna llena (Ilegami et al., 2014).

Se ha demostrado que las fases del ciclo lunar influyen en la estructura y la funcionalidad de la glándula pineal especialmente sobre los pinealocitos, cintas y esférulas sinápticas (Martínez-Soriano et al., 1984). Se ha observado que los cuerpos sinápticos fueron más numerosos y la concentración sérica de Melatonina aumentó durante la luna llena, así como también el tamaño del núcleo de los pinealocitos presentaron un diámetro mayor durante luna llena en comparación con luna nueva (Martínez-Soriano et al., 2002).

Gerasimov et al. (2014), indagó sobre los cambios morfológicos de los pinealocitos de ratones causados por la fase lunar, y se pudo comprobar que, tanto en el día como en la noche, el

tamaño de las vesículas secretoras granulares relacionadas con la actividad secretora de los pinealocitos, fue más de 5 veces mayor y el diámetro de las vesículas fue considerablemente menor en 1,8 veces en luna llena que en luna nueva.

Los cambios del campo geomagnético de la tierra causados por la rotación de la luna alrededor del planeta (Bell and Defouw 1966; Stolov 1965), podrían influir en la secreción de Melatonina, como se indicó anteriormente, y, de esta manera, explicar los cambios biológicos causados por el ciclo lunar en varias especies de mamíferos.

4. Materiales y métodos

4.1 Ubicación del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en el Campus Yanuncay de la Universidad de Cuenca.

4.2 Animales

Se utilizaron 80 cobayas de una línea genética mejorada, de entre 2 y 3 meses de edad, púberes, nulíparas y clínicamente sanas, las cuales tuvieron un peso promedio de $1.061,2 \pm 90,0$ g. Las cobayas fueron proporcionadas por la granja del “Imperio del Cuy”, ubicada en Bulán, Paute, Provincia del Azuay.

4.3 Manejo de animales en la granja

En la granja, los reproductores se localizan en pozas de 1,5 x 1,2 metros ($1,8 \text{ m}^2$) con una relación de un macho por cada ocho hembras (relación 8:1). Los animales en la etapa de crecimiento se encuentran alojados en pozas de producción con una población de 10 animales por m^2 . El alimento consistió de 85 % de una mezcla de forrajes, 70 % alfalfa [*Medicago sativa*] y 30 % de gramíneas: pasto raigras [*Lolium perenne*], maralfalfa [*Pennisetum* sp], pasto azul [*Dactylis glomerata*] administrado dos veces al día. Adicional a esto se suministró 15 % de alimento balanceado (+ afrechillo) (16 % proteína) y agua de bebida.

4.4 Manejo de animales y eutanasia

Materiales

- Caja de acrílico

- Dispositivo de dislocación cervical
- Anestésico inhalatorio (Sevoflurano, SEVOTROY 250, S45208)

Las cobayas fueron entregadas un día antes de la recolección de las muestras de los tejidos. Se colocaron en un lugar fresco, tranquilo, con ausencia de luz y con una alimentación semejante a la que recibieron en la granja productora. La eutanasia y colecta de tejido se realizó entre las 21H00 y 22H00 de cada día del ciclo lunar, para lo cual los animales estuvieron en ayunas desde aproximadamente 12 horas.

Los animales fueron anestesiados con Sevoflurano dentro de una caja de acrílico de 45 cm de largo y 30 cm de ancho. Una vez que se comprobó que el animal estaba en un estado de inconsciencia, se procedió a la dislocación cervical usando un dispositivo de acero inoxidable especialmente diseñado para tal fin (Walsh et al., 2017).

4.5 Grupos experimentales

En base a la luminosidad de la luna, el ciclo lunar fue dividido en cuatro cuartos: 1^{ro}: de luna nueva a cuarto creciente; 2^{do} de cuarto creciente a luna llena; 3^{ro} de luna llena a cuarto menguante; 4^{to} de cuarto menguante a luna nueva. Basados en esta división del ciclo lunar, las muestras de bazo se recolectaron en cada uno de los cuatro momentos indicados en la Figura 1. En cada ciclo lunar se emplearon cinco cobayas, y las muestras se recolectaron durante cuatro ciclos lunares consecutivos. La información acerca del porcentaje de luminosidad lunar se obtuvo del Observatorio Naval de Estados Unidos. (<https://aa.usno.navy.mil/data/MoonFraction>).

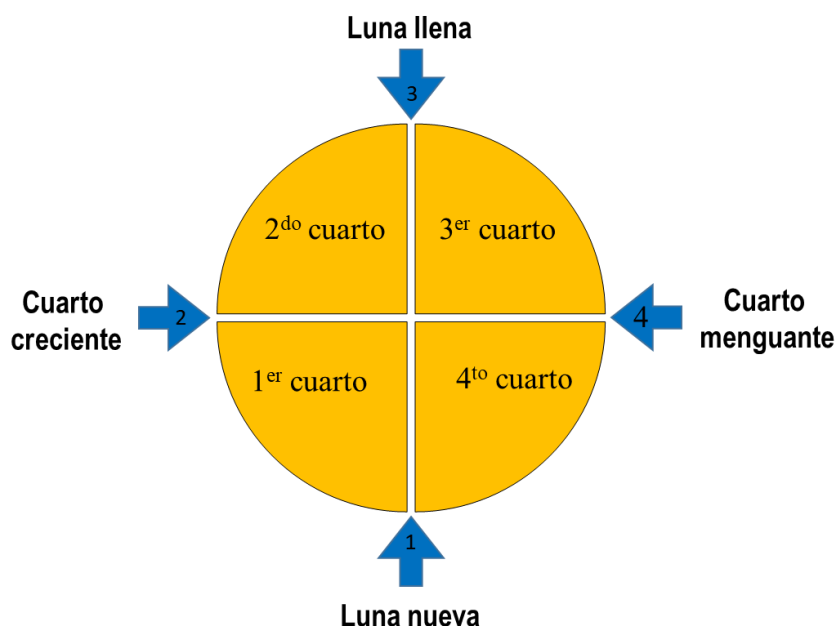


Figura 1. Ciclo lunar fraccionado en cuatro fases. Las flechas naranjas señalan los cuatro momentos del ciclo lunar en los que se van a recolectar los tejidos

4.6 Toma de muestras de tejido y procesamiento de tejido

Materiales

- Mandil
- Capuchas
- Guantes de látex descartables
- Balanza analítica (FLB FORELIBRA, MT104)
- Reactivo TRI Reagent (Invitrogen, No. cat.: AM9738)
- Tubos Eppendorf

Procedimiento

Una vez verificada la ausencia de signos vitales en las cobayas, éstas fueron ubicadas en decúbito dorsal y realizó una incisión longitudinal en la línea alba. Se ubicó el bazo en el lado izquierdo de la cavidad abdominal y se extrajo con sumo cuidado, para realizar los estudios descritos a continuación.

El bazo de cada una de las cobayas fue pesado en una balanza analítica (0,0001 a 100 gramos). Tres de los cinco bazos extraídos fueron elegidos al azar para determinar la expresión génica de las IL-1, IL-6 e IL-8. Brevemente, se pesaron en la balanza analítica

aproximadamente 30 mg de tejido que se colocó en tubos Eppendorf con 1 ml de reactivo TRI Reagent utilizado para la extracción de ARN.

4.7 Extracción del ARN

Materiales biológicos

- Muestras del bazo de cobayas

Soluciones

- 1-Bromo-3-Chloropropane (Sigma, No. cat.: B9673)
- Isopropanol (Sigma, No. cat.: 278465)
- Etanol al 70% (Sigma, No. cat.: E7148)
- Agua grado biomolecular (Sigma, No. cat.: W4502-L1)

Materiales de laboratorio y equipos

- Tubos Eppendorf
- Vortex
- Centrífuga (Eppendorf, 5430 R)
- Congeladora

Proceso para la extracción de ARN en muestras de bazo de cobayas

Para la disolución de las muestras de tejido se empleó el reactivo TRI Reagent caracterizado por ser una solución monofásica de Fenol e Isotiocianato de guanidina que diluye el material biológico y desnaturaliza las proteínas de manera simultánea. Posteriormente se añadió 100 µl de 1-Bromo-3-Chloropropane y se centrifugó por 10 minutos a 14.000 *g*. Mediante este proceso se obtuvo una muestra fraccionada en 3 partes: una acuosa que contenía el ARN, la interfase con el ADN y por último una orgánica conformada por las proteínas.

Se recolectó una alícuota de 450 µl de la parte acuosa de las muestras y se colocó en otro tubo Eppendorf al cual se le agregó 500 µl de Isopropanol, ambas muestras se mezclaron por inversión y se centrifugaron nuevamente a 14.000 *g* por 10 minutos con el objetivo de que se formara la pastilla del ARN total, eliminándose el líquido sobrenadante excedente.

Al sedimento remanente en el tubo se le añadió 500 µl de Etanol al 70 %, se limpió la superficie del tubo por inversión y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones antes descritas, el excedente se desechó nuevamente y el precipitado de ARN se secó a

temperatura ambiente hasta el siguiente día. Luego la pastilla fue resuspendida en 25 µl de agua grado biomolecular y las muestras de ARN total fueron almacenadas a -80 °C.

4.8 Cuantificación del ARN

Materiales biológicos

- ARN total extraído de las muestras de bazo

Soluciones

- Agua bimolar

Materiales de laboratorio y equipos

- Pipetas con sus respectivas puntas
- Tubos Eppendorf
- Vortex
- Espectrofotómetro (Epoch-BioTek)
- Software Gen5, versión 3.03

Proceso para la cuantificación de ARN

Se colocaron 25 µL de agua en cada tubo Eppendorf, se mezcló y se dejó reposar por 10 minutos, con el fin de resuspender las muestras y lograr obtener una solución homogénea. A continuación, se colocaron 2 µl de muestra en la plataforma Take 3 del espectrofotómetro para cuantificar el material genético. Esta placa simula una placa de ELISA, donde se colocó en dos de los agujeros una sola muestra, en los siguientes dos agujeros, otra muestra y así sucesivamente, hasta acabar con las 48 muestras. Este es un sistema duplicado, y las muestras se analizaron por medio del software Gen5, versión 3.03. Este resultado sirvió para controlar la cantidad de muestra que se debe colocar en la reacción de transcripción reversa dependiendo de la muestra.

4.9 Síntesis del ADN complementario (cDNA)

Materiales biológicos

- ARN total extraído de las muestras de bazo

Soluciones

- Agua bimolar

- Test de dNTP's
- Enzima (OneScriptHot Reverse Transcriptase, No. cat.: G593)

Materiales de laboratorio y equipos

- Tubos Eppendorf.
- Vortex
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas
- Termociclador (nexus, GSX1)

Proceso para la síntesis del ADN complementario (cDNA)

Se trata de transcribir inversamente el ARN de baja abundancia, en un tubo Eppendorf de 0,2 ml se agregaron 40 µl de buffer de enzima, con 1 µl de RT-buffer a una concentración de 20 mmol, más 40 µl de reacción dNTP's. En otro tubo, se añadió agua bimolar a un volumen dependiendo de la concentración calculada de ARN en cada muestra junto con 12 µl de RT-premix y la concentración de ARN en µl.

Con la última mezcla realizada, se le añadió 2 µl de enzima en tubos Eppendorf de 0,2 ml y se homogenizó en un vórtex para pasar al termociclador por aproximadamente 1 hora (Anexo 1).

Además, se realizó un control con seis muestras con el objeto de demostrar la presencia de material genético (Anexo 2).

Tabla 2. Curva de temperatura de alineamiento

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C)	51.0	51.4	52.2	55.5	55.4	57	58.9	60.6	62.5	63.8	64.6	65.0
Tubo No:	1		2			3			4			5

4.10 Amplificación del material genético

Materiales biológicos

- Muestra de ADN total extraído de las muestras del bazo de cobayas

Soluciones

- Agua grado biomolecular (Sigma, No. cat.: W4502-L1)

- Enzima Taq ADN polimerasa, con la solución buffer de amplificación (DreamTaq, EP0702)
- Solución de los dNTP's a 10 mM (Thermoscientific Cat. no.: R0182)
- Solución de oligonucleótidos gen específicos (Macrogen)

Materiales de laboratorio y equipos

- Tubos Eppendorf
- Termociclador (nexus, GSX1)
- Vortex
- Centrífuga (Eppendorf, 5430 R)
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas
- Refrigeradora

Procedimiento para la amplificación del ADN total de las muestras de bazo de cobayas

Se retiraron los reactivos y las muestras de ADN complementario o cDNA/ADNc de los sitios de almacenamiento y se procedió a su descongelamiento. En un tubo Eppendorf de 2 ml se colocaron los reactivos de manera ordenada para completar un volumen de 25 μ l por reacción, luego se preparó la premezcla que se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos de premezcla para amplificación de material genético del bazo de cobayas

Reactivo	Concentración		Volumen de premezcla por reacción
	Inicial	Final	
Agua grado biología molecular.	No aplica	No aplica	17.6 μ l
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	2.5 μ l
Solución de dNTP's	10 mM c/u	0.2mM c/u	0.5 μ l
Oligonucleótido gen específico Forward	100 μ M	0.4 μ M	0.1 μ l
Oligonucleótido gen específico Reverse	100 μ M	0.4 μ M	0.1 μ l
Enzima Taq	5 U/ μ l	0.05 U/ μ l	0.2 μ l
Muestra de ADN total	25 ng/ μ l	5 ng/ μ l	4 μ l
Volumen final			125 μ l

Posteriormente en 16 tubos para PCR se colocaron 21 μ l de la premezcla, además se añadieron 4 μ l de ADN total en cada uno y, de esto modos se obtuvieron 48 reacciones, cada una de ellas con un volumen total de 25 μ l. Se colocaron los tubos en el termociclador en el

que se programaron los siguientes ciclos de temperatura. Para determinar una temperatura de hibridación adecuada se programaron 5 temperaturas distintas:

Tabla 4. Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético del bazo de cobayas

Paso		Tiempo (min', seg'')	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial		5' 00''	94 °C
33 ciclos	Desnaturalización	00' 20''	94 °C
	Alineamiento	00' 20''	52.2 °C < 57.1 °C
	Extensión	00' 15''	72 °C
Extensión final		5' 00''	72 °C
Almacenamiento		∞	10 °C

4.11 Detección de productos amplificados

Materiales biológicos

- Productos de PCR

Materiales químicos y reactivos

- Agarosa (Invitrogen, Cat. no.: 16500-100).
- Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, Cat. no.: T4661, A6283, EDS, S8045)
- Solución de bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma Cat. no.: E7637)
- Solución buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 Mm de EDTA, pH 8.0, 0.3% de Azul de Bromofenol, 0.3 de Xilencianol y 30% de Glicerol) (Sigma, Cat. no.: T4661, 320332, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516)
- Solución con el marcador de peso molecular (Invitrogen No. cat.: 10488058)

Materiales de laboratorio y equipos

- Micropipetas
- Puntas para las micropipetas
- Microtubos Eppendorf de distintos volúmenes
- Tubos de PCR
- Vortex
- Cámara de electroforesis horizontal (Compact Multi-Wide, Biometra)
- Horno de microondas
- Balanza analítica
- Transiluminador

- Fotodocumentador (Molecular Imager Gel Doc XR+, No. cat.: 721BR12279)
- Software Quantity One® 1-D

Proceso para la detección de productos amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la elaboración del gel se pesaron 1.08 g de agarosa que se agregó en un matraz de Erlenmeyer junto con 90 ml de solución buffer TAE 1x. Para disolver la agarosa se utilizó un horno de microondas, una vez enfriada la solución de agarosa se adicionó 10 mg/ml de bromuro de etidio y posteriormente se colocó en un molde vacío con dos peines para formar las filas de pozos.

Una vez gelificada la solución se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y se adicionó la cantidad necesaria de buffer TAE 1X para cubrir el gel completamente. A continuación, se cargaron 15 μ l (10 μ l de la reacción de PCR más 5 μ l de la solución buffer de carga para ADN) de cada una de las muestras en cada pocillo del gel, y en el pocillo de inicio se coloca 5 μ l de marcador de peso molecular del ADN.

Luego, la cámara de electroforesis se conectó a una corriente eléctrica a 90 voltios por 30 a 45 min. Una vez que los productos de PCR se separaron, se procedió a visualizarlos en el transiluminador y se tomó una imagen del mismo con ayuda del fotodocumentador. Se tomó como amplificación positiva la visualización de una banda de 808 bp.

Todas las muestras positivas con este ensayo fueron sometidas a PCR para la identificación de interleucinas 1, 6 y 8.

Se colocó 10 μ L de producto de PCR junto con 5 μ L del marcador de peso molecular en un gel al 1.5% de agarosa - TAE, con bromuro de etidio durante 1 hora a 100 voltios. Posteriormente, los geles se fotodocumentaron y se recopiló la información por medio del Software Quantity One® 1-D

4.12 Variables de estudio

Variables dependientes

- Peso del bazo
- Índice bazo-somático
- Expresión génica de las interleucinas 1, 6 y 8

Variables independientes

- Fase lunar (luna nueva, cuarto creciente, luna llena, cuarto menguante)
- Ciclo lunar (1-4)

Covariables

- Animal (1-48)
- Peso corporal

4.13 Análisis estadístico

El efecto del ciclo lunar en el peso del bazo e índice bazo-somático se analizó mediante el análisis de varianza utilizando el procedimiento lineal general (GLM) del programa estadístico SAS. Las medias se compararon con la prueba de los mínimos cuadrados. Se consideraron significativas los valores $< 0,05$. Se utilizó el software KyPlot para la representación de datos.

5. Resultados

El ciclo lunar afectó el peso del bazo ($P = 0,0385$). Como se observa en la **Figura 2**, el peso de este órgano fue significativamente mayor en cuarto creciente que en luna llena y luna nueva, sin diferencia estadística con cuarto menguante.

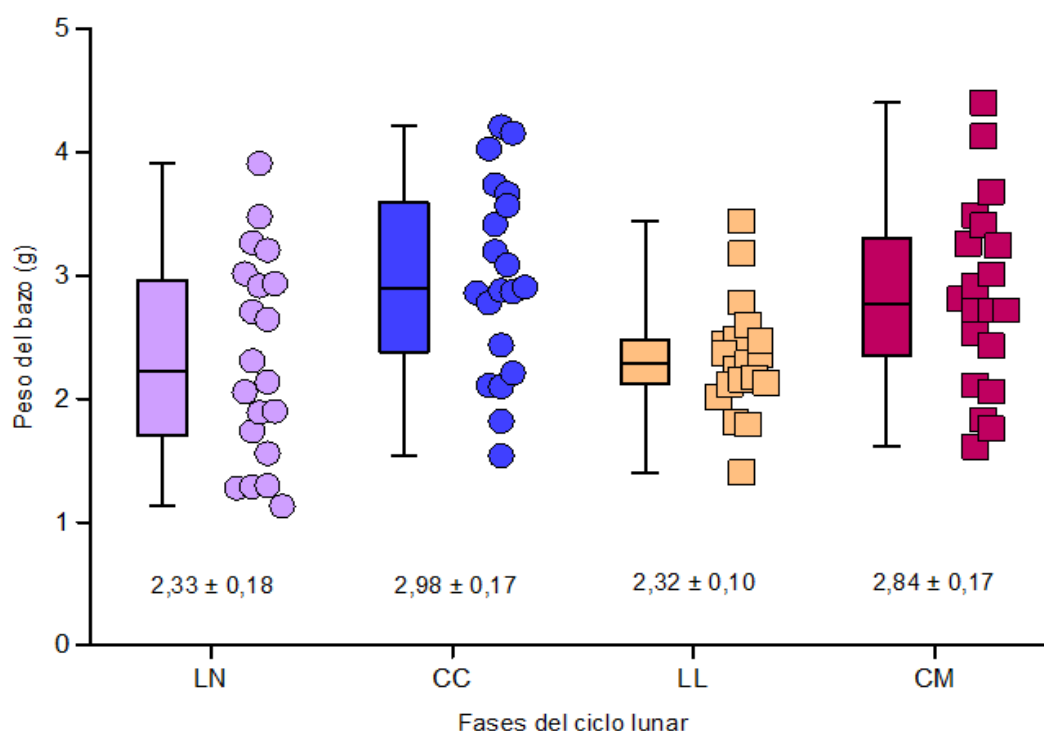


Figura 2. Peso del bazo de cobayas nulíparas de acuerdo a la fase del ciclo lunar. LN: luna nueva; CC: cuarto creciente, LL: luna llena; CM: cuarto menguante. Diferencias estadísticas entre fases: $^{LN-CC} p = 0,0244$; $^{CC-LL} p = 0,0301$. Media $\pm$ EE en la parte inferior del gráfico.

El índice bazo somático tuvo valores más altos en cuarto creciente que en luna nueva y luna

llena, sin diferencia estadística entre las demás comparaciones (**Figura 3**).

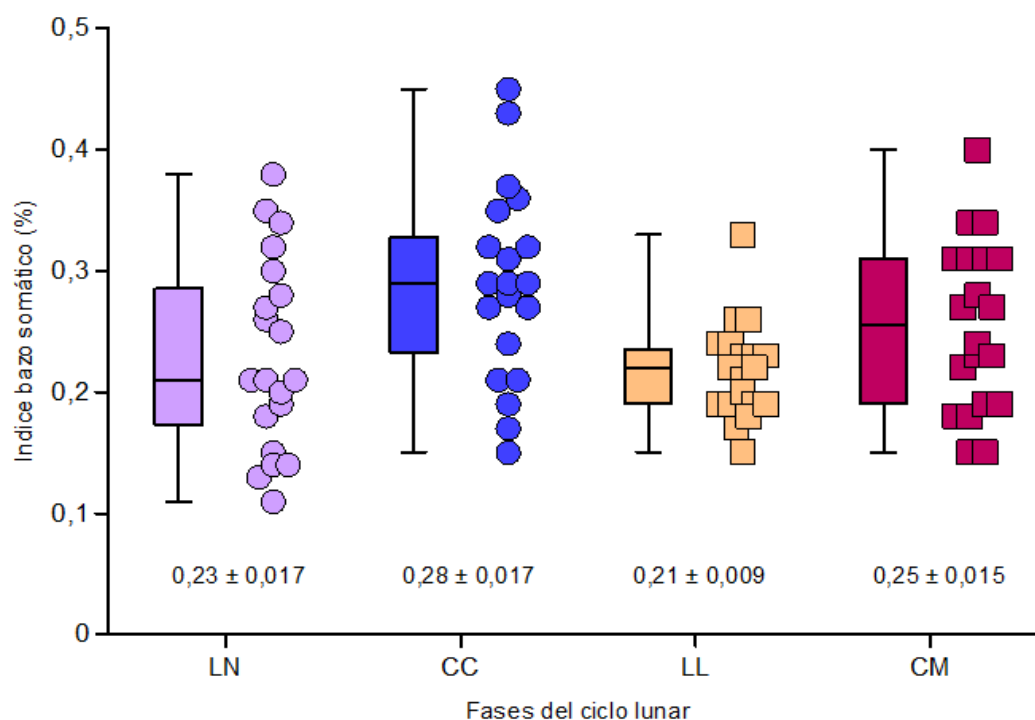


Figura 3. Índice bazo somático [(peso del bazo/peso corporal) x 100] en cobayas nulíparas de acuerdo a la fase del ciclo lunar. LN: luna nueva; CC: cuarto creciente, LL: luna llena; CM: cuarto menguante. Diferencias estadísticas entre fases: $^{LN-CC} p = 0,0197$; $^{CC-LL} p = 0,0174$. Media ± EE en la parte inferior del gráfico.

La expresión del gen de GAPDH, que indica la presencia de ARN que codifica una proteína expresada constitutivamente (*housekeeping gene*), se observa bastante uniforme en las cuatro fases de cada ciclo lunar (**Figura 4**).

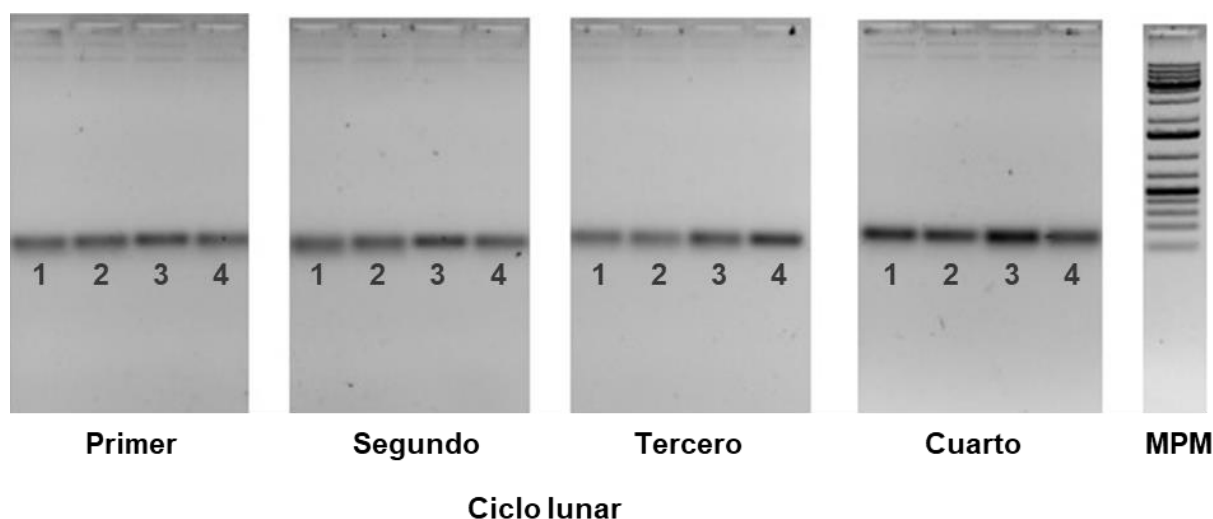


Figura 4. Electroforesis de productos de PCR de GAPDH. Utilizado como gen de control en gel de agarosa al 1.5 %. 1: LN (luna nueva), 2: CC (cuarto creciente), 3: LL (luna llena), 4: CM (cuarto menguante), MPM: marcador de peso molecular.

Con respecto a la IL-1 β , en la **Figura 5** se observa una cantidad constante de ARN en cada una de las fases del ciclo lunar por lo que se puede asumir que no existió influencia en la expresión de este gen por efecto de la fase lunar.

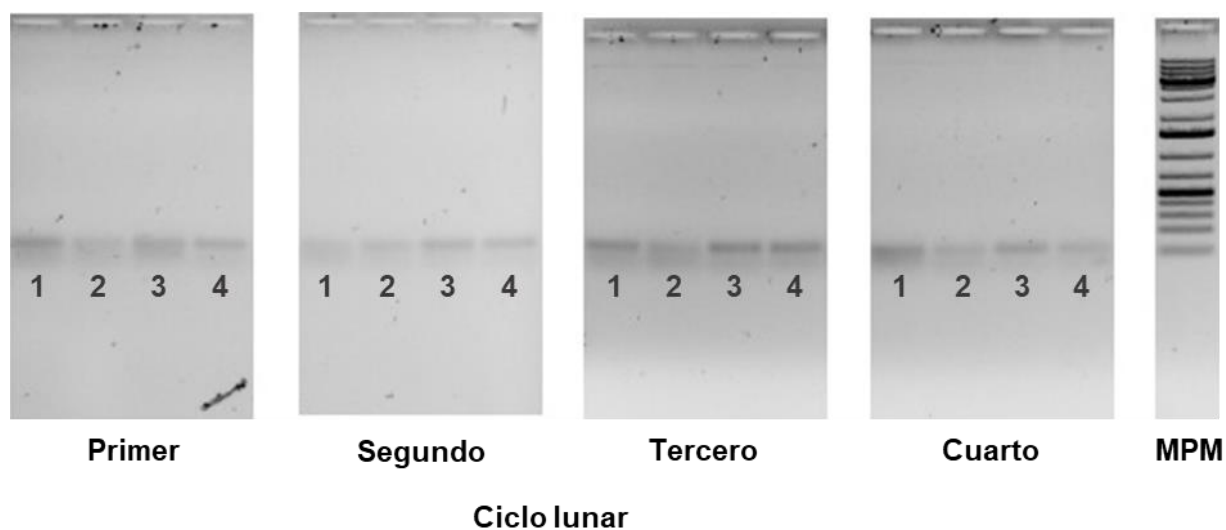


Figura 5. Electroforesis de productos de PCR del gen de la IL-1 β . Elaborado en gel de agarosa al 1.5 %. 1: LN (luna nueva), 2: CC (cuarto creciente), 3: LL (luna llena), 4: CM (cuarto menguante), MPM: marcador de peso molecular.

En la **Figura 6** se muestra que el gen de la IL-6 tiene, en general, valores variables de ARN en todas las fases del ciclo lunar. Basado en esto se infiere que no hubo influencia de la fase lunar en la expresión de este gen.

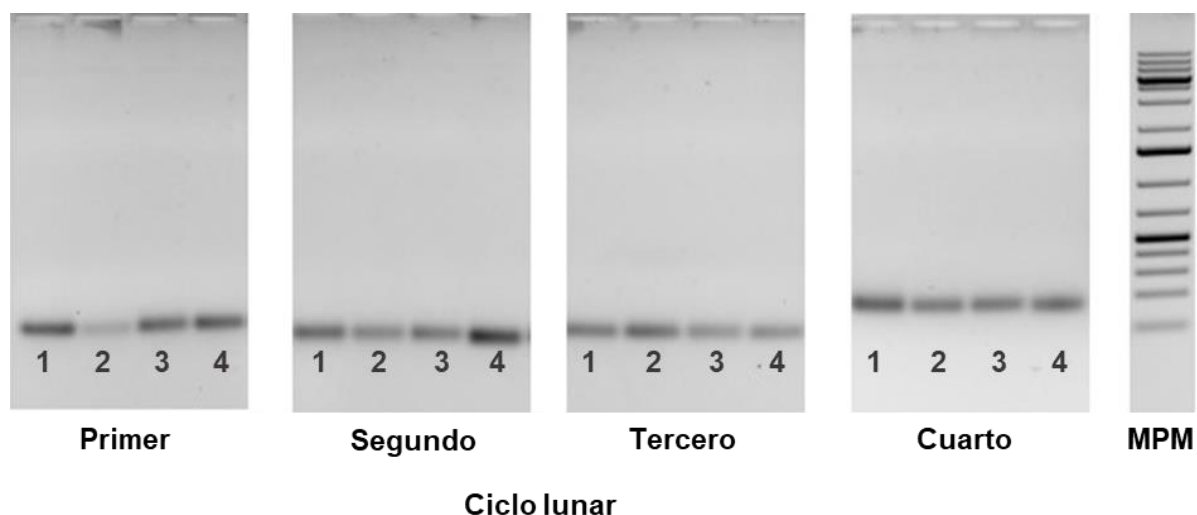


Figura 6. Electroforesis de productos de PCR del gen de la IL-6. *Elaborado en gel de agarosa al 1.5 %.* 1: LN (luna nueva), 2: CC (cuarto creciente), 3: LL (luna llena), 4: CM (cuarto menguante), MPM: marcador de peso molecular.

Para la IL-8, se visualizó la ausencia de un patrón que indique influencia del ciclo lunar sobre la expresión de este gen, como se observa en la **Figura 7**. Se asume que puede haber influencia cuando el patrón tiende a repetirse en al menos tres de los cuatro ciclos, lo cual no se presenta en este caso.

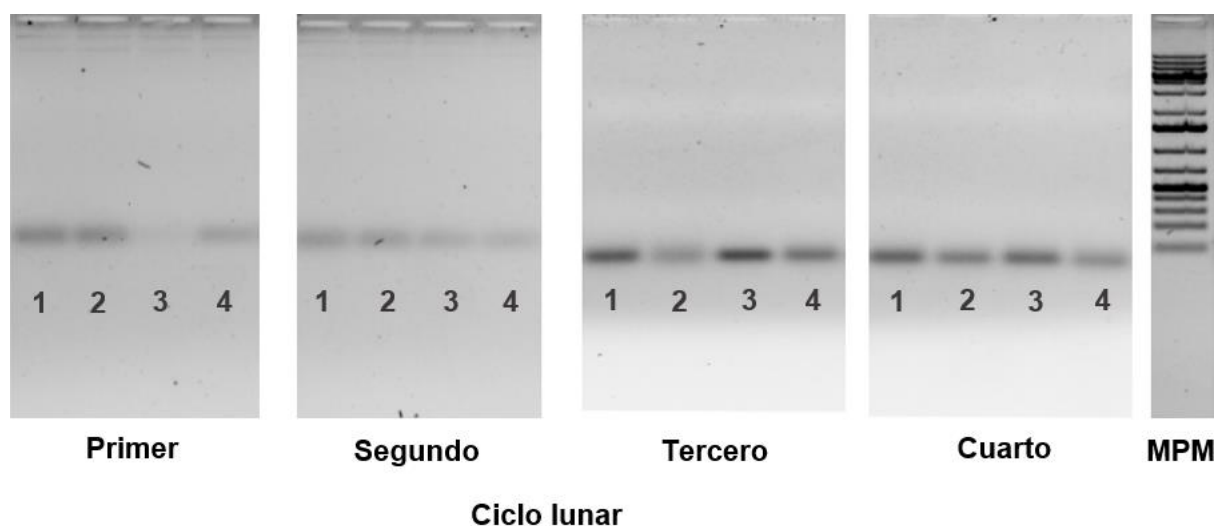


Figura 7. Electroforesis de productos de PCR del gen de la IL-8. *Elaborado en gel de agarosa al 1.5 %.* 1: LN (luna nueva), 2: CC (cuarto creciente), 3: LL (luna llena), 4: CM (cuarto menguante), MPM: marcador de peso molecular.

6. Discusión

Este estudio tiene como novedoso el haber comprobado un efecto del ciclo lunar en el peso

del bazo y en el índice bazo somático en cobayas nulíparas. El bazo es uno de los órganos linfoides secundarios que depura la sangre (pulpa roja) y juega un rol inmunológico clave (pulpa blanca) en la detección y presentación de antígenos por parte de células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B (inmunidad adaptativa), y en la eliminación de bacterias por parte de macrófagos y neutrófilos (inmunidad innata) (Mebius and Kraal, 2005; Crane et al., 2021).

El bazo es muy vascularizado y puede variar su masa por diversas causas. Por ejemplo, numerosos estudios han demostrado variación del volumen esplénico luego de la alimentación en humanos y otros mamíferos (Garnitschnig et al., 2020), que se atribuyó al incremento o disminución del flujo sanguíneo a este órgano. Asimismo, en una especie silvestre de ratón (*Clethrionomys rutilus*) se observaron importantes fluctuaciones en el peso del bazo por efecto de la estación del año (Sealand et al., 1967), que se asociaron con variación en el número de reticulocitos en la sangre periférica. En este estudio se observó un aumento significativo del peso del bazo, y de la relación del peso de este órgano con el peso corporal, en cuarto creciente, presumiblemente debido a un mayor volumen de sangre en el órgano en esa fase lunar.

No hay una explicación clara sobre el mecanismo fisiológico que pudo haber causado este incremento. En una investigación paralela a este estudio, se tomaron muestras de sangre en los mismos animales y se observó un incremento significativo del porcentaje de neutrófilos en cuarto menguante en relación a las demás fases lunares (Jiménez y Portilla; datos no publicados). Asimismo, el número de plaquetas circulantes fue alrededor de 50 mil más, y el porcentaje de linfocitos fue mayor en cuarto creciente y luna llena que en luna nueva y cuarto menguante ($p > 0.05$). De igual modo, hubo mayor número de glóbulos rojos, mayor concentración de hemoglobina y porcentaje de hematocrito en cuarto creciente que en las demás fases del ciclo lunar ($p > 0.05$). Curiosamente, la concentración sérica de globulinas y proteínas totales fue estadísticamente mayor en cuarto creciente que en las demás fases del ciclo lunar (Jiménez y Portilla; datos no publicados).

El conjunto de hallazgos indicados previamente parecen asociar el aumento de la masa del bazo con el incremento de elementos formes y proteínas sanguíneas. Sin embargo, no queda claro porque el bazo y estos componentes sanguíneos incrementaron en esta fase particular del ciclo lunar. Hay evidencias que muestran una relación entre el ciclo lunar y la glándula pineal. En ratas (Martínez-Soriano et al., 2002a; Martínez-Soriano et al., 2002b) y ratones (Gerasimov et al., 2014) la glándula pineal experimentó cambios estructurales y funcionales indicativos de una mayor capacidad de secreción de Melatonina en luna llena que en luna nueva. Aparentemente, este efecto de la luna en la pineal ocurre por la influencia que tiene nuestro satélite en el campo geomagnético del planeta (Bell and Defouw 1966; Stolov 1965), cuya variación es detectada por cierta población de pinealocitos (Welker, 1983; Reuss & Vollrath, 1983; Cremer-Bartels et al, 1984).

Sumado a esto, Gerasimov et al. (2014), en su estudio sobre la influencia de la luna sobre la glándula pineal, también estudiaron, a manera de control, cambios estructurales de las glándulas salivares submaxilares. Estas glándulas exocrinas portadoras de receptores de Melatonina (Isola et al., 2016), tuvieron un mayor número de vesículas secretoras grandes en luna llena que en luna nueva (Gerasimov et al., 2014). Esto hace pensar que la Melatonina, modulada por el ciclo lunar, puede producir cambios fisiológicos y/o morfológicos en los tejidos periféricos que expresan sus receptores.

En relación a esto, existe evidencia que remarca la comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino del que forma parte la Melatonina y la glándula pineal (Solá-Morabita, 2020). Se demostró que la ablación de la glándula pineal provocó pérdida de peso de los tejidos linfoides primarios y secundarios y un decrecimiento en los componentes celulares que intervienen en la respuesta inmune innata y adquirida (Solá-Morabita, 2020).

Arias et al., (2003), demostró que la Melatonina actúa de forma directa sobre la proliferación linfocitaria, y el mismo autor infirió que esto se debe a que existen receptores de alta afinidad para dicha hormona ubicados en los esplenocitos que provocan una elevación significativa en la producción de IL-2 y IL-1 β . Sola-Morabita. (2020), determinaron que la Melatonina provocó un incremento en la actividad de los linfocitos NK y, adicionalmente, un aumento del tamaño de los órganos inmunes.

Además, Gutiérrez y Lucero (datos no publicados), en las mismas muestras de bazo de cobayas utilizadas en este estudio observaron subjetivamente que los receptores tipo A y B de Melatonina se expresaron en el bazo de cobayas con una intensidad mayor en luna nueva en comparación con las demás fases del ciclo lunar. Aunque el aumento aparente del receptor de Melatonina por efecto de la luna ocurrió aproximadamente 7 días antes de que el bazo experimentara una masa mayor, ambos hechos podrían estar relacionados. Podría especularse que la mayor cantidad de receptores para Melatonina en luna nueva pudieron haber actuado como un factor determinante en el aumento del tamaño del bazo en cuarto creciente provocando un mayor flujo de sangre cargada con mayor contenido de proteínas totales, mayor de linfocitos y otras células del sistema inmune.

Zimecky (2006), al realizar estudios en ardillas de la palma de la jungla encontró que la Melatonina y los esteroides son los principales candidatos a ejercer una función reguladora sobre el sistema inmune cuyos niveles de acción se ven afectados por el ciclo lunar. Este autor analizó los efectos del ciclo lunar sobre la respuesta de anticuerpos frente a un antígeno T dependiente en eritrocitos de ovejas, y observó un patrón regular en todos los meses lunares, con respuestas máximas durante las fases de luna llena.

En función de estos hallazgos se planteó como otro objetivo de esta investigación analizar el efecto del ciclo lunar en la expresión de las interleucinas 1, 6 y 8. En el siguiente trabajo se

encontró que los genes de estas citoquinas se expresaron en las muestras de tejido esplácnico con intensidad variable en las cuatro fases lunares. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de un método netamente cualitativo como es la intensidad de los productos en un gel luego de la electroforesis, no mostraron un patrón de variación en la expresión de las IL-1 β , IL-6 y IL-8 que pudiera atribuirse a un efecto de la luna. Es necesario utilizar métodos semicuantitativos o cuantitativos para poder obtener resultados concluyentes al respecto.

7. Conclusiones

- El ciclo lunar influenció el peso del bazo y el índice bazo somático de cobayas nulíparas, cuyos valores fueron mayores en cuarto creciente que en las demás fases del ciclo lunar.
- Se identificó el ARNm de las interleucinas 1, 6 y 8 en el bazo de cobayas nulíparas. La intensidad de los productos del PCR luego de la electroforesis en las cuatro fases lunares, no mostró un patrón que se repitiera en los cuatro ciclos lunares consecutivos, y que indicara un efecto de la luna en estos genes.

8. Referencias

- Alonso, M. M. (2020). La Melatonina, novedosa biomolécula con propiedades anticancerígenas: mecanismos de acciones antitumorales. revisión narrativa. *Universidad de Valladolid*.
<https://uvadoc.uva.es/handle/10324/51280>
- Apostolopoulos, J., Davenport, P. & Tipping, P. (1996). Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16(8), 1007-1012. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.16.8.1007>
- Argüelles, R., & Bonmatí Carrión, M. Á. (2015). Melatonina, la hormona de la noche. *Universidad de Murcia-Eubacteria*, nº 33. <http://hdl.handle.net/10201/45910>
- Arias, J., Melean, E., Nereida, V., Pons, H., Chacín-Bonilla, Larreal, Y., & Bonilla, E. (2003). Efecto de la Melatonina en la Proliferación Linfocitaria y la Producción de Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 1 Beta (IL-1b) en Esplenocitos de Ratones. *Investigación Clínica*, 44(1), 41-50. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332003000100005&lng=es&tlng=es.
- Arias, J., Melean, E., Valero, N., Pons, H., Chacín-Bonilla, L., Larreal, Y. & Bonilla, E. (2003). Efecto de la Melatonina en la proliferación linfocitaria y la producción de Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 1 beta (IL-1b) en esplenocitos de ratones. *Investigación Clínica*, 44(1), 41-50.
- Aucapiña, C. & Marín, A. (2016). Efecto de la extirpación de las espículas del glande del cuy como técnica de esterilización reproductiva y su influencia en agresividad y ganancia de peso en comparación con un método químico (alcohol yodado 2%). Universidad de Cuenca. Cuenca.
- Bevington, M. (2015). Lunar biological effects and the magnetosphere. *Pathophysiology*, 22(4): 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2015.08.005>
- Cabrerizo, D. & Loja A. (2017). TLOs: Cuando el sistema inmune se asienta en el campo de batalla. Calero, S., Zaderenko, A., Anta, J. & Merklings, P. (Eds.), *MOLEQLA*, 27 (pp. 13-15). Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España: ISSN 2173-0903
- Cantaro Segura, J. L., Delgado Palma, D., & Cayetano Robles, J. L. (2021). Caracterización de la crianza de cuyes en una zona de la sierra de Huarochirí -Perú: Jose Luis Cantaro Segura, Diana Delgado Palma, Jovana Luz Cayetano Robles. *Revista De Investigación E Innovación Agropecuaria Y De Recursos Naturales*, 8(2), 72–78. <https://doi.org/10.53287/hffs7980xc24q>
- Carrillo, A., Lardone, P.J., Álvarez, N., Rodríguez, A. & Guerrero, J.M. (2013). Melatonin: Buffering the Immune System. *International Journal Molecular Sciences*, 14(4), 8638-8683. doi:10.3390/ijms14048638
- Cesta, M.F. (2006). Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic Pathology*, 35 (5). <https://doi.org/10.1080/01926230600867743>
- Chowdhury, S. D., Pramanik, S., Bhattacharjee, K. & Mondal, L. K. (2020). Effects of lunar cycle on fasting plasma glucose, heart rate and blood pressure in type 2 diabetic patients. *Chronobiology International*, 38(2), 270-277. <https://doi.org/10.1080/07420528.2020.1842754>
- Cipolla-Neto, J., & Amaral, F. G. D. (2018). Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocrine reviews*, 39(6), 990–1028. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>

- Correa, L.M., & Rivero F., J.L. (2017). Influencia de la Melatonina sobre la fisiología y la conducta de ungulados. *Revista de Investigaciones Altoandinas – Journal of High Andean Research*, 19(3), 337-350. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.298>
- Correa, R. F. (2021). Avaliação do comportamento da IL-6 E IL-17 em ratas ováriohisterectomizadas com tratamento de Melatonina. *Universidade Positivo*.
- Crane, G. M., Liu, Y. C., & Chadburn, A. (2021). Spleen: development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 38(2), 112-124. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2020.06.003>.
- Dergaa, I., Saifeddin, M., Romdhani, M., Ben Saad, H., Varma, A., Ben, A., Brijeshkumar, G., Mokhtar, C., Souissi, N. & Hammouda, O. (2021). Does lunar cycle affect biological parameters in young healthy men? *Chronobiology International*, 38(6), 933-940. <https://doi.org/10.1080/07420528.2021.1897609>
- Dominguez, A., Abreu, P., Garcia, M., De la Rosa, A., Vargas, M., Marrero, F. (2003). Ritmo luz/oscuridad de las citocinas proinflamatorias en el infarto agudo de miocardio. *Revista española de Cardiología*, 56(6), 555-560. <https://doi.org/10.1157/13048152>
- El-Darawany, A.-H. A., El-Tarabany, M. S., Al-Marakby, K. M., & Atta, M. A. (2021). Effect of lunar cycle on some reproductive aspects of female goats. *Biological Rhythm Research*, 52(3), 355–366. <https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1600264>
- Esteban MÁ, Cuesta A, Chaves-Pozo E, Meseguer J. Influence of Melatonin on the Immune System of Fish: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(4):7979-7999. <https://doi.org/10.3390/ijms14047979>
- Estrada Miño, E. E., & Velastegui Bosquez, G. A. (2021). Caracterización de la carne de cuy empacado al vacío. Un estudio para su exportación. *Revista Ingeniería*, 5(12), 123–134. <https://doi.org/10.33996/revistaingenieria.v5i12.79>
- Flores-Mancheno, C. I., Duarte, C., & Salgado-Tello, I. P. (2017). Caracterización de la carne de cuy (*Cavia porcellus*) para utilizarla en la elaboración de un embutido fermentado. *Ciencia y Agricultura*, 14(1), 39-45. <https://doi.org/10.19053/01228420.v14.n1.2017.608>
- Garlanda, C., Dinarello, C. & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6). 1003-10018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>
- Garnitschnig, L., Weinzirl, J., Andrae, L., Scheffers, T., Ostermann, T., & Heusser, P. (2020). Postprandial dynamics of splenic volume in healthy volunteers. *Physiological Reports*, 8(2), e14319. <https://doi.org/10.14814/phy2.14319>
- Geramisov, A., Kostychenko, V., Soloviera, A. & Olovnikov, A. (2014). Pineal gland as an endocrine gravitational lunasensor: Manifestation of moon-phase dependent morphological changes in mice. *Biochemistry*, 79(10), doi: <https://doi.org/10.1134/s0006297914100083>
- Hargaden, M. & Singer, L. (2012). Chapter 20 - Anatomy, physiology, and behavior. Suckow, M., Stevens, K. & Wilson, R. (Eds.). *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents* (pp. 575-602). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1>
- Herman, A. P., Bochenek, J., Król, K., Krawczynska, A., Antushevich, H., Pawlina, B., Herman, A., Romanowicz, K. & Tomaszewska, D. (2016). Central Interleukin-1 β Suppresses the Nocturnal Secretion of Melatonin. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1-15. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/2589483>.
- Ikegami, T., Takeuchi, Y., Hur, S.P., Takemura, A. (2014). Lunar clock in fish reproduction. In: Numata H and Helm B, editors. *Annual, Lunar, and Tidal Clocks, Patterns and Mechanisms of Nature's Enigmatic Rhythms*. Tokyo. Japan: Springer. p. 163-178.

- Isola, M., Ekstrom, J., Lilliu, M.A., Isola, R., Loy, F. (2016). Dynamics of the melatonin MT1 receptor in the rat parotid gland upon melatonin administration. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 67(1), 111-119. www.jpp.krakow.pl
- Lin, T., Buffenstein, R. (2021). El inusual sistema inmunológico de la rata topo desnuda. En: Buffenstein, R., Park, T.J., Holmes, M.M. (eds.), *La extraordinaria biología de la rata topo desnuda. Avances en medicina y biología experimentales*, vol 1319. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65943-1_12
- Mage, R.G. (2005). Rabbit Immune System. In: Vohr, H.W. (eds). *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi.org/10.1007/3-540-27806-0_1248
- Martínez-Soriano, F., Armañanzas, E., Ruíz-Torner A., Valverde-Navarro, A.A. (2002b). Influence of light/dark, seasonal and lunar cycles on serum melatonin levels and synaptic bodies number of the pineal gland of the rat. *Histology and Histopathology*, 17, 213-222. <https://doi.org/10.14670/HH-17.213>.
- Martínez-Soriano, F., Armañanzas, E., Ruiz, A. & Valverde A. (2002a). Influence of light/dark, seasonal and lunar cycles on the nuclear size of the pinealocyte. *Histology and Histopathology*, 17(1), 205-212. <https://doi.org/10.14670/HH-17.205>.
- Martínez-Soriano, F., Welker, H. & Vollrath, L. (1984). Correlation of the number of pineal "synaptic" ribbons and spherules with the level of serum melatonin over a 24-hour period in male rabbits. *Cell and Tissue Research*, 236(3), 555-560.
- Matheus, N., Mendoza, C., Mesomero, J. & Alcalde, A. (2012). La Melatonina, un potente inmunomodulador. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara*, 2(1).
- Matsuda, T. & Kishimoto, T. (1998). Interleukin 6. *Encyclopedia of immunology (Second Edition)*, 1458-1461: <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0371>
- Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature reviews immunology*, 5(8), 606-616. *Mechanisms of Nature's Enigmatic Rhythms*. Tokyo. Japan: Springer. p. 163-178.
- Mendoza, M. (2015). Evaluación fenotípica y comportamiento productivo de *Cavia porcellus* (cuyes) de acuerdo al color desde el nacimiento hasta el inicio de la vida reproductiva para la parroquia de Guaytacama. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.
- Moini, J., Badolato, C. & Ahangari, R. (2020). Chapter 3 - Immunology. *Epidemiology of endocrine tumors* (pp. 55-82). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822187-7.000>
- Olcese, J. M. (1990). The neurobiology of magnetic field detection in rodents. *Prog. Neurobiol.* 35, 325-330. [doi:10.1016/0301-0082\(90\)90016-A](https://doi.org/10.1016/0301-0082(90)90016-A)
- Olcese, J., Reuss, S., & Semm, P. (1988). Geomagnetic field detection in rodents. *Life sciences*, 42(6), 605-613. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(88\)90451-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90451-1)
- Padilla-Carlin, D. J., McMurray, D. N., & Hickey, A. J. (2008). The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comparative medicine*, 58(4), 324-340.
- Pévet P. (2002). Melatonin. *Dialogues in clinical neuroscience*, 4(1), 57-72. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2002.4.1/ppevet>
- Pritt, S. (2012). Chapter 19 - Taxonomy and History. Suckow, M., Stevens, K. & Wilson, R. (Eds.), *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents* (pp. 563-574). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00019-5>
- Reiter R. J. (1992). Alterations of the circadian melatonin rhythm by the electromagnetic spectrum: a study in environmental toxicology. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 15(3), 226-244. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90035-8](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90035-8)
- Remick, D. (2005). Interleukin-8. *Critical Care Medicine*, 33(12) S466-S467. [10.1097/01.CCM.0000186783.34908.18](https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186783.34908.18)

- Reuss, S., & Vollrath, L. (1983). Different types of magnetically sensitive cells in the pineal gland. *Neuroscience Letters*, 40(1), 23-26. doi: 10.1016/0304-3940(83)90086-1
- Reuss, S., Semm, P., & Vollrath, L. (1983). Different types of magnetically sensitive cells in the rat pineal gland. *Neuroscience letters*, 40(1), 23–26. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90086-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90086-1)
- Rosen, L. A., Barber, I., & Lyle, D. B. (1998). A 0.5 G, 60 Hz magnetic field suppresses melatonin production in pinealocytes. *Bioelectromagnetics*, 19(2), 123–127.
- Ruiz, B., Cruz, D., Estrada, I. & Wong, I. (2017). Las células linfoides innatas y su papel en la regulación de la respuesta inmune. *Revista alergia México*, 64(3), 347 -363. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i3.284>
- Sealand, J. A., & Bickerstaff, L. K. (1967). Seasonal changes in reticulocyte number and in relative weights of the spleen, thymus, and kidneys in the northern red-backed mouse. *Canadian Journal of Zoology*, 45(3), 253-260. <https://doi.org/10.1139/z67-036>
- Solá-Morabito (2020). Melatonina y sus acciones protectoras y osteodiferenciadoras sobre células mesenquimales gingivales de rata. Universidad Nacional de Córdoba. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28898.76486>
- Taylor, D. K., & Lee, V. K. (2012). Guinea pigs as experimental models. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 705-744). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00025-0>
- Vainer, A. M., Rocha, V. S., & Juvenale, M. (2021). Melatonina e sistema imune: uma relação com duas vias regulatórias/ Melatonin and the immune system: a two-way relationship regulator.y. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(1), 2906–2929. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n1-234>.
- Valdés Tovar, M., Asai, M., & Matamoros Trejo, G. (2003). Efecto de la Melatonina sobre la concentración de péptidos opioides en el sistema inmune de la rata. *Salud Mental*, 26(3),46-56. ISSN: 0185-3325. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=58232606>
- Velázquez, L., Verdugo, A., Rodríguez, L. & Borca, M. (2019). The role of interleukin 6 during viral infections. *Frontiers in Microbiology*, 10: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01057>
- Vinther, A. G., & Claësson, M. H. (2015). Melatonins indvirkning på immunsystem og cancer [The influence of melatonin on the immune system and cancer]. *Ugeskrift for læger*, 177(21), V10140568.
- Walsh, J. L., Percival, A., & Turner, P. V. (2017). Efficacy of Blunt Force Trauma, a Novel Mechanical Cervical Dislocation Device, and a Non-Penetrating Captive Bolt Device for On-Farm Euthanasia of Pre-Weaned Kits, Growers, and Adult Commercial Meat Rabbits. *Animals: an open access journal from MDPI*, 7(12), 100. <https://doi.org/10.3390/ani7120100>
- Welker, H. A., Semm, P., Willig, R. P., Commentz, J. C., Wiltschko, W., & Vollrath, L. (1983). Effects of an artificial magnetic field on serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content of the rat pineal gland. *Experimental brain research*, 50(2-3), 426–432. <https://doi.org/10.1007/BF00239209>
- Welker, H., Semm, P., Willig, R., Commentz, J., Wiltschko, W. & Vollrath, L. (1983). Effects of an artificial magnetic field on serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content of the rat pineal gland. *Experimental Brain Research*, 50, 426-432.
- Westreicher Díaz, M. D., Chávez Reátegui, A. H., & Navarrete Zamora, M. B. (2022). Estudio macro y microscópico de la glándula pineal de la alpaca adulta (Vicugna pacos). *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 33(4), e23338. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i4.23338>

- Whary, M., Baumgarth, N., Fox, J. & Barthold, S. (2015). Chapter 3 - Biology and Diseases of Mice. Fox, J., Anderson, L., Otto, G., Pritchett-Corning, K. & Whary, M. (Eds.), *Laboratory animal medicine*, (pp. 43-149). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00003-1>
- Wilson, B. W., Anderson, L. E., Hilton, D. I., & Phillips, R. D. (1981). Chronic exposure to 60-Hz electric fields: effects on pineal function in the rat. *Bioelectromagnetics*, 2(4), 371–380. <https://doi.org/10.1002/bem.2250020408>
- Wilson, B. W., Stevens, R. G., & Anderson, L. E. (1989). Neuroendocrine mediated effects of electromagnetic-field exposure: possible role of the pineal gland. *Life sciences*, 45(15), 1319–1332. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90018-0)
- Yaga, K., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Nieves, H., Sun, J. H., & Chen, L. D. (1993). Pineal sensitivity to pulsed static magnetic fields changes during the photoperiod. *Brain research bulletin*, 30(1-2), 153–156. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90052-d](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90052-d)
- Zhang, J. & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinic*, 45 (2), 27-37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822187-7.00024-4>
- Zimecki, M. (2006). The lunar cycle: Effects on human and animal behavior and psychology. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*. 60. 1-7.

9. Anexos

Anexo A. Clasificación de datos en los cuatro momentos del ciclo lunar en 4 ciclos consecutivos.

# de ciclo	Etapas del ciclo lunar	# de cuy	Peso de cuy en gramos	Peso de bazo en gramos	Peso del bazo/Peso del cuy en gramos	Peso del bazo/Peso del cuy en %
1	LN	1	862	1,283	0,0015	0,15
1	LN	2	987	1,293	0,0013	0,13
1	LN	3	954	1,299	0,0014	0,14
1	LN	4	1010	1,133	0,0011	0,11
1	LN	5	970	1,741	0,0018	0,18
1	CC	1	1063	1,819	0,0017	0,17
1	CC	2	1108	2,109	0,0019	0,19
1	CC	3	1075	2,856	0,0027	0,27
1	CC	4	971	3,420	0,0035	0,35
1	CC	5	1008	3,204	0,0032	0,32
1	LL	1	1040	2,010	0,0019	0,19
1	LL	2	1202	3,178	0,0026	0,26
1	LL	3	1031	2,450	0,0024	0,24
1	LL	4	950	1,399	0,0015	0,15
1	LL	5	1038	2,479	0,0024	0,24
1	CM	1	1114	4,404	0,0040	0,40
1	CM	2	1110	3,488	0,0031	0,31
1	CM	3	1256	2,806	0,0022	0,22
1	CM	4	1208	2,721	0,0023	0,23
1	CM	5	997	1,827	0,0018	0,18
2	LN	1	1046	2,714	0,0026	0,26
2	LN	2	1130	3,024	0,0027	0,27
2	LN	3	1037	2,920	0,0028	0,28
2	LN	4	1044	2,646	0,0025	0,25
2	LN	5	1107	1,556	0,0014	0,14
2	CC	1	1150	2,782	0,0024	0,24
2	CC	2	1200	3,740	0,0031	0,31
2	CC	3	1015	3,671	0,0036	0,36
2	CC	4	1050	3,090	0,0029	0,29
2	CC	5	1100	3,573	0,0032	0,32
2	LL	1	1053	3,436	0,0033	0,33
2	LL	2	1017	2,372	0,0023	0,23
2	LL	3	1074	5,782	0,0054	0,54
2	LL	4	1054	2,775	0,0026	0,26
2	LL	5	1032	2,245	0,0022	0,22
2	CM	1	1097	3,678	0,0034	0,34
2	CM	2	1059	3,261	0,0031	0,31
2	CM	3	1043	2,527	0,0024	0,24

2	CM	4	1014	2,724	0,0027	0,27
2	CM	5	1047	2,916	0,0028	0,28
3	LN	1	1000	3,481	0,0035	0,35
3	LN	2	1033	3,914	0,0038	0,38
3	LN	3	1193	2,310	0,0019	0,19
3	LN	4	1010	3,271	0,0032	0,32
3	LN	5	1001	2,056	0,0021	0,21
3	CC	1	1030	2,882	0,0028	0,28
3	CC	2	1061	1,542	0,0015	0,15
3	CC	3	1001	2,872	0,0029	0,29
3	CC	4	1004	2,101	0,0021	0,21
3	CC	5	1051	2,206	0,0021	0,21
3	LL	1	1085	1,811	0,0017	0,17
3	LL	2	1108	2,293	0,0021	0,21
3	LL	3	1350	2,596	0,0019	0,19
3	LL	4	1043	2,355	0,0023	0,23
3	LL	5	1086	2,119	0,0020	0,20
3	CM	1	1084	3,407	0,0031	0,31
3	CM	2	1201	2,114	0,0018	0,18
3	CM	3	1107	3,007	0,0027	0,27
3	CM	4	1293	2,427	0,0019	0,19
3	CM	5	1229	4,128	0,0034	0,34
4	LN	1	949	3,213	0,0034	0,34
4	LN	2	1022	2,144	0,0021	0,21
4	LN	3	940	1,892	0,0020	0,20
4	LN	4	919	1,904	0,0021	0,21
4	LN	5	985	2,940	0,0030	0,30
4	CC	1	1014	2,910	0,0029	0,29
4	CC	2	1090	4,030	0,0037	0,37
4	CC	3	989	4,214	0,0043	0,43
4	CC	4	917	4,155	0,0045	0,45
4	CC	5	914	2,438	0,0027	0,27
4	LL	1	951	1,788	0,0019	0,19
4	LL	2	945	2,156	0,0023	0,23
4	LL	3	1181	2,167	0,0018	0,18
4	LL	4	1114	2,128	0,0019	0,19
4	LL	5	1113	2,470	0,0022	0,22
4	CM	1	1054	1,613	0,0015	0,15
4	CM	2	1049	3,237	0,0031	0,31
4	CM	3	1198	1,758	0,0015	0,15
4	CM	4	1166	2,718	0,0023	0,23
4	CM	5	1092	2,056	0,0019	0,19

Anexo B. Clasificación de las muestras del bazo de cobayas según las fases del ciclo lunar

Ciclo	Etapas del ciclo lunar	# de cuy	# de muestra
1	LN	1	1
1	LN	2	2
1	LN	3	3
1	CC	1	4
1	CC	3	5
1	CC	5	6
1	LL	2	7
1	LL	3	8
1	LL	4	9
1	CM	1	10
1	CM	2	11
1	CM	3	12
2	LN	1	13
2	LN	3	14
2	LN	5	15
2	CC	2	16
2	CC	3	17
2	CC	4	18
2	LL	1	19
2	LL	2	20
2	LL	3	21
2	CM	2	22
2	CM	4	23
2	CM	5	24
3	LN	1	25
3	LN	2	26
3	LN	3	27
3	CC	1	28
3	CC	4	29
3	CC	5	30
3	LL	2	31
3	LL	3	32
3	LL	4	33
3	CM	2	34
3	CM	3	35
3	CM	5	36
4	LN	1	37
4	LN	4	38
4	LN	5	39
4	CC	2	40
4	CC	3	41
4	CC	4	42
4	LL	1	43
4	LL	2	44
4	LL	3	45
4	CM	1	46

4	CM	4	47
4	CM	5	48

Anexo C. Componentes para la síntesis del ADN complementario (cNDA)

Muestra no.:	ng/ml	ug/ul	vol para 1.34 ug	Volumen por reacción:				
				Volumen para 4 ug	H2O para 26 ul	RT-premix (ul)	enzima (ul)	total
1	307.28	0.31	4.4	10.5	15.5	12	2	40
2	550.04	0.55	2.4					
3	361.44	0.36	3.7					
4	272.92	0.27	4.9	12.5	13.5	12	2	40
5	344.64	0.34	3.9					
6	358.68	0.36	3.7					
7	442.68	0.44	3.0	8.7	17.3	12	2	40
8	592.16	0.59	2.3					
9	391.76	0.39	3.4					
10	394.24	0.39	3.4	8.7	17.3	12	2	40
11	626.48	0.63	2.1					
12	429.6	0.43	3.1					
13	197.26	0.20	6.8	19.6	6.4	12	2	40
14	245.64	0.25	5.5					
15	181.08	0.18	7.4					
16	374.24	0.37	3.6	11.3	14.7	12	2	40
17	345.68	0.35	3.9					
18	345.52	0.35	3.9					
19	395.68	0.40	3.4	11.0	15.0	12	2	40
20	279.92	0.28	4.8					
21	480.64	0.48	2.8					
22	372.6	0.37	3.6	12.0	14.0	12	2	40
23	621.04	0.62	2.2					
24	215.28	0.22	6.2					
25	503.92	0.50	2.7	9.0	17.0	12	2	40
26	485.44	0.49	2.8					
27	372.04	0.37	3.6					
28	233.72	0.23	5.7	11.3	14.7	12	2	40
29	401.84	0.40	3.3					
30	608.72	0.61	2.2					
31	329.12	0.33	4.1	19.5	6.5	12	2	40
32	180.56	0.18	7.4					
33	168.36	0.17	8.0					
34	305.56	0.31	4.4	12.0	14.0	12	2	40
35	265.44	0.27	5.0					
36	522.16	0.52	2.6					
37	312.2	0.31	4.3	14.0	12.0	12	2	40
38	281.44	0.28	4.8					
39	271.44	0.27	4.9					
40	295.44	0.30	4.5	14.6	11.4	12	2	40
41	207.24	0.21	6.5					
42	376.4	0.38	3.6					
43	416.6	0.42	3.2	13.7	12.3	12	2	40
44	350.12	0.35	3.8					
45	201.04	0.20	6.7					
46	302.8	0.30	4.4	14.6	11.4	12	2	40
47	204.28	0.20	6.6					
48	371.08	0.37	3.6					

Anexo D. Control/componentes para la síntesis del ADN complementario (cNDA)

Muestra no.:	ng/ml	ug/ul	vol para 2 ug	Volumen por reacción:			
				Volumen para 13 ug	RT-premix (ul)	enzima (ul)	total
2	550.04	0.55	3.6	9.4	6	1	20
8	592.16	0.59	3.4	9.6	6	1	20
11	626.48	0.63	3.2	9.8	6	1	20
23	621.04	0.62	3.2	9.8	6	1	20
30	608.72	0.61	3.3	9.7	6	1	20
36	522.12	0.52	3.8	9.2	6	1	20

Anexo E. Manejo de animales y eutanasia

Cobayas dentro de la caja de acrílico



Cobaya en dispositivo de dislocación cervical

Anexo F. Toma de muestras de tejido y procesamiento de tejido



Bazo de cobaya



Muestra del bazo en el reactivo TRI Reagent.

Anexo G. Extracción del ARN



Obtención de muestra fraccionada en 3 partes



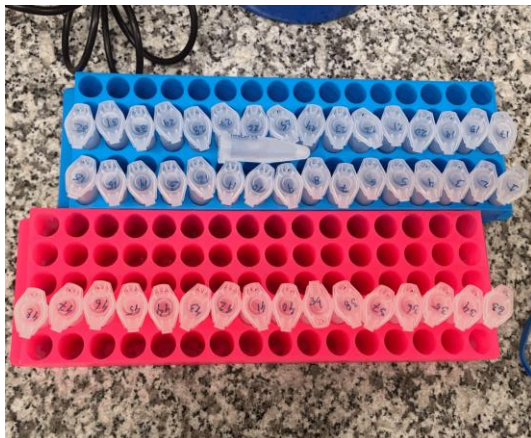
Pastilla de ARN total formada en el fondo del tubo

Anexo H. Cuantificación del ARN

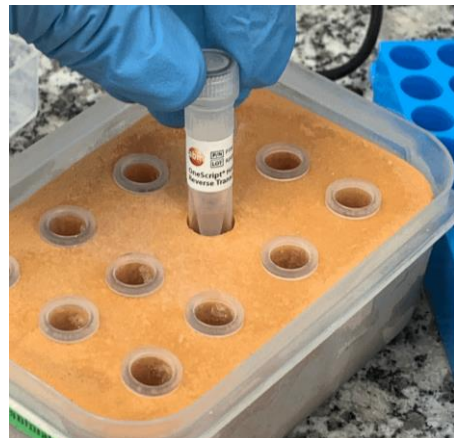
Plataforma take 3 del espectrofotómetro



Espectrofotómetro Epoch-BioTek

Anexo I. Síntesis del ADN complementario (cDNA)

ARN total extraído de las muestras de bazo



Enzima OneScriptHot Reverse Transcriptase

Anexo J. Amplificación del material genético



Muestras de cDNA



Solución de oligonucleótidos gen específico

Anexo K. Detección de productos amplificados



Gel de electroforesis previamente cargado con productos de PCR



Marcador de peso molecular