

**ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN IN SILICO DE LOS GENES EXPRESADOS
DIFERENCIALMENTE ENTRE JUVENILES Y ADULTOS DE LA TORTUGA CAGUAMA
(*Caretta caretta*) RELACIONADOS CON HIPOXIA Y SISTEMA INMUNE: PRIMERA
APROXIMACIÓN**

CATALINA RIVERA FORERO

Trabajo de formación para la investigación para optar al título de Bióloga Marina

**Director
JAVIER ADOLFO HERNANDEZ FERNANDEZ
PhD. Ciencias Biológicas**

Semillero de Investigación GENBIMOL - Genética, Biología Molecular y Bioinformática

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
BOGOTÁ D.C.
2023**

**ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN IN SILICO DE LOS GENES EXPRESADOS
DIFERENCIALMENTE ENTRE JUVENILES Y ADULTOS DE LA TORTUGA CAGUAMA
(*Caretta caretta*) RELACIONADOS CON HIPOXIA Y SISTEMA INMUNE: PRIMERA
APROXIMACIÓN**

**IN SILICO ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED
DIFFERENTIALLY BETWEEN JUVENILES AND ADULTS OF THE LOGGERHEAD
TURTLE (*Caretta caretta*) RELATED TO HYPOXIA AND IMMUNE SYSTEM: FIRST
APPROACH**

Catalina Rivera-Forero¹
catalina.riveraf@utadeo.edu.co

RESUMEN

Las diferentes condiciones que experimenta *Caretta caretta* durante su ciclo de vida, dada su longevidad y capacidad de migrar grandes distancias, se refleja en cambios cualitativos y cuantitativos en la expresión de genes en las diferentes etapas de vida de la especie que pueden revelarse a través del análisis del transcriptoma. En este estudio se realizó un análisis de expresión diferencial de genes, comparando transcriptomas de tortugas adultas (Adul) y tortugas juveniles (Juv), y se relacionaron con hipoxia y respuesta inmune. Las secuencias usadas corresponden a tortugas en cautiverio anidantes del Caribe colombiano, disponibles en GenBank, las cuales se filtraron (Trimmomatic), alinearon, mapearon (HISAT2) y ensamblaron (StringTie) contra un transcriptoma de referencia. El nivel de expresión de las lecturas de cada transcriptoma se cuantificó (featureCounts) para el análisis de expresión diferencial (DESeq2) y los genes se anotaron funcionalmente (Blast2GO-OmicsBox). Se mapearon correctamente el 84 % de las lecturas, y de la comparación Adul versus Juv, se identificaron 1401 genes expresados diferencialmente (DEG) ($p\text{-aj} < 0,05$), 507 regulados al alza y 894 a la baja (\log_2 fold-change). Se logró anotar funcionalmente el 40 % de los DEG, identificando 8252 términos GO y 583 rutas de referencia de la ontología KEGG, en dónde sobresale la respuesta inmunológica, la respuesta al estrés oxidativo, y el metabolismo de carbohidratos. Se proponen posibles mecanismos y rutas metabólicas implicadas con la expresión de estos genes, según su función y el nivel de expresión en cada estadio. Lo planteado en las hipótesis sugeridas debe ser sometido a investigación desde enfoques más específicos que consideren la medición de variables no evaluadas en la presente investigación.

PALABRAS CLAVE

Hipoxia, Transcriptómica, Ensamblaje, Anotación funcional, RNA-Seq

ABSTRACT

The different conditions experienced by *Caretta caretta* during their life cycle, due to its longevity and the ability to migrate long distances, are reflected in qualitative and quantitative changes in gene expression at different life stages of the species that can be revealed through transcriptome analysis. In this study, a differential gene expression analysis was performed, comparing transcriptomes of adult turtles (Adul) and juvenile turtles (Juv), and related to hypoxia and immune response. The sequences used correspond to captive nesting turtles from the Colombian Caribbean, available in GenBank, these sequences were filtered (Trimmomatic), aligned, mapped (HISAT2) and assembled (StringTie) against a reference transcriptome. The expression level of reads from each transcriptome were quantified (featureCounts) for differential expression analysis (DESeq2) and genes were functionally annotated (Blast2GO-OmicsBox). 84% of reads were correctly mapped, and from the Adul versus Juv comparison, 1401 differentially expressed genes (DEGs) were identified ($p\text{-adj} < 0.05$), 507 up-regulated and 894 down-regulated (\log_2 fold-change). 40 % of the DEGs were functionally annotated, identifying 8252 GO terms and 583 reference pathways of the KEGG ontology, where the immune response, oxidative stress response, and carbohydrate metabolism stand out. Possible mechanisms and metabolic pathways involved with the expression of these genes are proposed, according to their function and level of expression in each stage. The suggested hypotheses should be subjected to research from more specific approaches that consider the measurement of variables not evaluated in the present investigation.

KEY WORDS

Hypoxia, Transcriptomics, Assembly, Functional annotation, RNA-Seq

INTRODUCCIÓN

La tortuga caguama (*Caretta caretta*) es una especie de interés en la investigación, especialmente en conservación por su condición de especie en estado vulnerable (Cásale y Tucker, 2017), y por tener la capacidad de mantener e influir en los hábitats en los cuales se encuentra, a través de la provisión de bienes y servicios ecosistémicos, (Marco *et al.*, 2008; Teelucksingh *et al.*, 2010), los cuales están relacionados con las características propias de las tortugas caguama, que a su vez le dan el potencial de ser un organismo modelo para dilucidar las bases moleculares y fisiológicas de aspectos como: la longevidad, la tolerancia a la anoxia y las adaptaciones que le permiten la migración a través de grandes distancias (Teelucksingh *et al.*, 2010; Hernández-Fernández *et al.*, 2017; Banerjee *et al.*, 2021).

Ha sido de especial interés el estudio de los mecanismos adaptativos, fisiológicos y anatómicos relacionados con la capacidad de apnea de las tortugas marinas, dado que pasan la mayor parte de su vida bajo el agua, a excepción de intervalos en los que ascienden a la superficie para respirar (Tenney *et al.*, 1974). Específicamente *Caretta caretta* permanece sumergida alrededor del 90 % de su tiempo,

variando este porcentaje dependiendo del tipo de actividad que se encuentre realizando, permaneciendo alrededor del 10 % de su tiempo en superficie durante la anidación, solo un 9 % durante la búsqueda de alimento y un 14 % durante la migración (Block *et al.*, 2011; Iverson *et al.*, 2019); contando con un volumen pulmonar máximo entre el 7.9 y 8.9 % del peso total corporal, que tiene la capacidad de retener el 72 % del oxígeno total calculado en ~ 22.2 ml kg⁻¹ de peso y una sangre arterial normóxica saturada en un 93 %, en donde las tortugas pequeñas consumen más de las reservas de oxígeno por unidad de masa que las grandes (Lapennas y Lutz, 1982; Lutz y Bentley, 1985; Hochscheid *et al.*, 2007b), contando con una serie de adaptaciones para la tolerancia a la hipoxia como la disminución en el metabolismo o las reservas de O₂ aumentadas (Lutcavage *et al.*, 1990; Milton, 1994). Algunas de las adaptaciones asociadas a la hipoxia se han investigado en tortugas de agua dulce, a través de un estudio realizado respecto a la regulación metabólica y la expresión génica asociadas a la tolerancia a esta condición, encontrando genes sensibles a los bajos niveles de oxígeno, como las subunidades codificadas mitocondrialmente de la cadena de transporte de electrones, enzimas antioxidantes, proteínas de choque, proteínas de almacenamiento de hierro e inhibidores de serina proteasa (Storey, 2007), sin embargo, la expresión génica con relación a la respuesta y tolerancia a la hipoxia en las tortugas marinas aún no ha sido dilucidada y para el caso de *C. caretta* aún desconocida.

La historia de vida de *Caretta caretta*, somete a las tortugas a diversas condiciones a lo largo de su ciclo de vida, especialmente relacionadas con los movimientos migratorios que realizan en los cuales enfrentan una serie de desafíos ambientales, como la exposición a contaminantes que prevalecen en el medio marino (Keller *et al.*, 2004), lo que deriva en una respuesta a nivel del sistema inmunológico de las tortugas, cobrando gran relevancia el estudio de este aspecto, dado que es fundamental el monitoreo de la salud de las tortugas marinas para el manejo de sus poblaciones (Rousselet *et al.*, 2013). Si bien se han adelantado estudios alrededor de este tipo de respuesta en las tortugas caguama, la mayoría de ellos están enfocados al estudio de la respuesta a enfermedades como la fibropapilomatosis (Keller *et al.*, 2006), las funciones inmunitarias asociadas a la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos (Keller *et al.*, 2005), la fagocitosis o la actividad de las células asesinas naturales (Rousselet *et al.*, 2013), existiendo un vacío en el conocimiento en términos de las variaciones en el nivel de expresión génica de *C. caretta* con referencia al sistema inmunológico y su relación con otros procesos en las diferentes etapas de vida.

Asimismo, su tipo de historia de vida también genera que los ejemplares de *C. caretta* atraviesen una serie de cambios en los hábitos a lo largo de su desarrollo, iniciando su vida en una fase pelágica como neonatos, pasando a una fase nerítica en su etapa juvenil, para finalmente en la etapa adulta mantenerse la mayor parte de su vida en las zonas de alimentación, con migraciones ocasionales a los sitios de reproducción y anidación (Dolmán, 1990; Eckert *et al.*, 2000). La especie también se caracteriza por presentar tasas de crecimiento lentas y una maduración tardía (Mayne, et al., 2020), presentando

diferencias morfológicas entre estadíos. Los neonatos exhiben cuerpos con tonos grises oscuros, que posteriormente cambian en su fase juvenil, adquiriendo los tonos marrones rojizos característicos de *C. caretta*, etapa en la que también aparecen de dos a tres quillas dorsales formadas por las escamas vertebrales imbricadas y un borde aserrado en el espaldar correspondiente a las escamas marginales, caracteres que cambian a medida que el ejemplar se va aproximando a la madurez sexual, en donde los adultos se diferencian principalmente por exhibir espaldares aplanados con bordes romos y un evidente dimorfismo sexual (Marco *et al.*, 2008). Estas características específicas de cada estadío, pueden ser la clave para dilucidar aspectos de importancia en la especie para su conservación o esclarecer los mecanismos y rutas asociados a la longevidad, las adaptaciones a la hipoxia o la defensa a contaminantes u organismos patógenos en las tortugas caguama, a través del estudio de la variación en los perfiles de expresión génica en las diferentes etapas de vida (Álvarez *et al.*, 2015), aspecto que puede ser estudiado a través de datos transcriptómicos (Banerjee *et al.*, 2021).

El transcriptoma se constituye de moléculas de ARN codificante, no codificante y sus productos de degradación, componiéndose de todos los transcritos que están presentes en un organismo, órgano, tejido o célula, proporcionando un estimado del nivel de expresión de los genes en un momento específico, encontrándose en constantes cambios cualitativos y cuantitativos, reflejando procesos fisiológicos (Wang *et al.*, 2009; Ozsolak y Milos, 2011; Zmienko *et al.*, 2011). La cuantificación de los componentes del transcriptoma en los últimos años se ha realizado mediante tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), como la secuenciación de ARN (RNA-Seq), una tecnología que permite la secuenciación simultánea de millones de moléculas, otorgando la posibilidad de investigar diferentes transcriptomas a la vez en un tiempo corto (Zmienko *et al.*, 2011), permitiendo además la cuantificación e identificación de la expresión de isoformas y transcripciones desconocidas (Agarwal, 2010). Los estudios con RNA-Seq en *C. caretta*, se han realizado en su gran mayoría a partir de muestras de sangre, con enfoques relacionados con el análisis de aspectos como la genómica funcional (Hernandez-Fernandez *et al.*, 2017; Banerjee *et al.*, 2021), la respuesta a contaminantes (Cocci *et al.*, 2017; Cocci *et al.*, 2018; Hernández-Fernández *et al.*, 2021; Cocci *et al.*, 2022) o la respuesta a variaciones en la temperatura (Bentley *et al.*, 2017; Chow *et al.*, 2021). En donde, en algunos de ellos, en especial en aquellos en donde se comparan tratamientos o condiciones, se emplea un tipo de análisis basado en la identificación de genes expresados diferencialmente (DEG) (Metzker, 2010; McDermaid *et al.*, 2019), para este tipo de análisis se han creado modelos probabilísticos como DESeq2, en paquetes disponibles para los investigadores (Robinson *et al.*, 2010; Love *et al.*, 2014; Ritchie *et al.*, 2015; Chamorro, 2019). Estos paquetes, permiten realizar resúmenes visuales facilitando la consulta de datos individuales, el filtrado de datos en el gráfico, la asociación de tendencias en los modelos o la diferenciación de estos (Su *et al.*, 2017), además de generar archivos de salida con información cuantitativa de la expresión génica media en las réplicas de cada muestra, mediante el \log_2 fold-change y el p-valor ajustado (McDermaid *et al.*, 2019).

En el marco del vacío en el conocimiento que existe acerca de las diferencias que se presentan en los procesos fisiológicos y los perfiles de expresión génica entre las etapas de vida de *Caretta caretta*, la presente investigación pretende a través de un análisis de expresión diferencial, la identificación de los genes expresados diferencialmente (DEG), entre las variables representadas por los transcriptomas de tortugas juveniles y los transcriptomas de tortugas adultas, como condiciones de contraste, así como establecer las funciones con las que se relacionan, mediante un análisis de anotación funcional.

METODOLOGÍA

Obtención de datos

El análisis bioinformático se realizó utilizando la plataforma Galaxy - (<https://usegalaxy.org/>) (Afgan *et al.*, 2018). Las secuencias de extremos pareados de 101 bp de dos tortugas adultas y dos juveniles de *Caretta caretta* obtenidas previamente por Hernández-Fernández *et al.* (2021), se descargaron en formato fastq del repositorio de datos de Sequence Read Archive (SRA) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando los códigos de acceso (SRR10032989, SRR10032990, SRR10032991 y SRR5330501). Se empleó la herramienta dentro de la sección “Get Data”, denominada “Faster Download and Extract Reads in FASTQ” en la interfaz de la plataforma Galaxy. Se seleccionó como tipo de entrada la opción “SRA accession”, en donde se ingresaron los códigos de acceso anteriormente mencionados y se procedió a ejecutar la descarga utilizando los parámetros por defecto.

Evaluación de la calidad de las lecturas

Se evaluó la calidad de los datos transcriptómicos obtenidos, utilizando el programa FastQC (Andrews, 2018), disponible en la sección “FASTQ Quality Control” del menú de Galaxy. En la interfaz de FastQC se seleccionaron las cuatro secuencias crudas anteriormente descargadas, ejecutando el control de calidad sin modificar los parámetros por defecto del programa. Posteriormente se filtraron los adaptadores y las lecturas de baja calidad con Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), este programa se procesó para lecturas de extremos emparejados, seleccionando las lecturas directas e inversas. Las secuencias limpias a las que se les removieron los adaptadores y las lecturas de baja calidad se sometieron nuevamente a un control de calidad con FastQC, realizando el mismo procedimiento descrito anteriormente para las lecturas sin procesar.

Alineamiento y mapeo de las lecturas

El alineamiento y mapeo de las secuencias filtradas se realizó con HISAT2 (Kim *et al.*, 2015) contra el transcriptoma de referencia disponible en la base de datos del NCBI, BioProject: PRJNA826225 (Canada's Genomic Enterprise, 2022). Los datos de referencia se descargaron a través de la herramienta “NCBI Datasets Genomes” dentro del menú desplegable “Get Data”, realizando la descarga por acceso a BioProject. A las secuencias alineadas y mapeadas se les realizó un control de calidad con SAMtools

Stats (Li *et al.*, 2009) ubicado en la sección “SAM/BAM” del menú de Galaxy, en donde los archivos en formato BAM resultantes del alineamiento y mapeo se seleccionaron ejecutando la evaluación de calidad.

Ensamblaje del transcriptoma

El ensamblaje de los transcriptomas se realizó mediante StringTie (Kovaka *et al.*, 2019) disponible en la sección “RNA-Seq” de Galaxy. En la interfaz de StringTie se introdujeron los archivos en formato BAM de las lecturas mapeadas y alineadas y un archivo de referencia en formato GFF3 para guiar el ensamblaje, correspondiente a datos adicionales descargados de BioProject: PRJNA826225 (Canada's Genomic Enterprise, 2022), para la ejecución del ensamblaje manteniendo los parámetros por defecto del programa.

Conteos y nivel de expresión

Una vez obtenidos los transcriptomas ensamblados, se realizó la fase de la determinación del nivel de expresión de los transcritos, en donde se obtuvieron matrices de los conteos correspondientes a características genómicas, como genes o exones a través de la estimación de los niveles de expresión determinada mediante la cuantificación de las lecturas mapeadas, empleando el programa featureCounts (Liao *et al.*, 2014). Los transcriptomas previamente ensamblados fueron unificados a través de StringTie merge a un archivo GTF que contiene información sobre las coordenadas de los genes y es compatible con los archivos de entrada que solicita featureCounts para generar los conteos. Con el archivo GTF generado y los cuatro archivos en formato BAM producto del alineamiento y mapeo, a través de la interfaz de featureCounts encontrado en la sección “RNA-Seq”, se generaron las matrices de conteos necesarias para el análisis de expresión diferencial. A cada uno de los archivos resultantes se les asignó el nombre de la muestra a la que corresponden, en donde a los conteos de la secuencia de código SRR10032989 se designó como “Adulto 1”, los conteos de la secuencia SRR10032990 como “Adulto 2”, los de SRR10032991 como “Juvenil 1” y los de SRR5330501 como “Juvenil 2”.

Análisis de expresión diferencial y anotación funcional

El análisis de expresión diferencial se realizó empleando el paquete DESeq2 (Love *et al.*, 2014) el cual emplea como método de normalización la división de los conteos de cada gen en una muestra por el número total de lecturas en dicha muestra, realizando la comprobación de la expresión diferencial de cada transcrito mediante la realización de la prueba paramétrica de Wald (Chamorro, 2019). En la interfaz Galaxy el paquete DESeq2 se encuentra en la pestaña “RNA-Seq”; en esta fase, inicialmente se le indicó al programa que los conjuntos de datos se seleccionaron por nivel, y se le asignó un nombre al factor principal denominado como “Estadío”, se procedió a definir los niveles dentro del factor, en donde el primer nivel se designó con el nombre de “Adultos”, y se seleccionaron los dos archivos de los conteos correspondientes a las dos muestras de adultos. Este mismo proceso se repitió en el recuadro

del segundo nivel, pero seleccionando los archivos de conteo de las muestras de los dos juveniles, asignándole el nombre “Juveniles” a ese nivel, y se ejecutó el programa con los parámetros por defecto, obteniendo además de los datos cuantitativos, gráficos correspondientes al análisis de componentes principales, un MA-plot y un diagrama de dispersión de los datos. Finalmente se realizó un mapa de calor con la herramienta Heatmap w ggplot de Galaxy v.3.3.5+galaxy0 (Afgan *et al.*, 2018) y la anotación funcional de los genes expresados diferencialmente, contrastando con tres bases de datos (EggNOG, GO y KEGG) empleando los programas Blast2GO y OmicsBox (Conesa *et al.*, 2005).

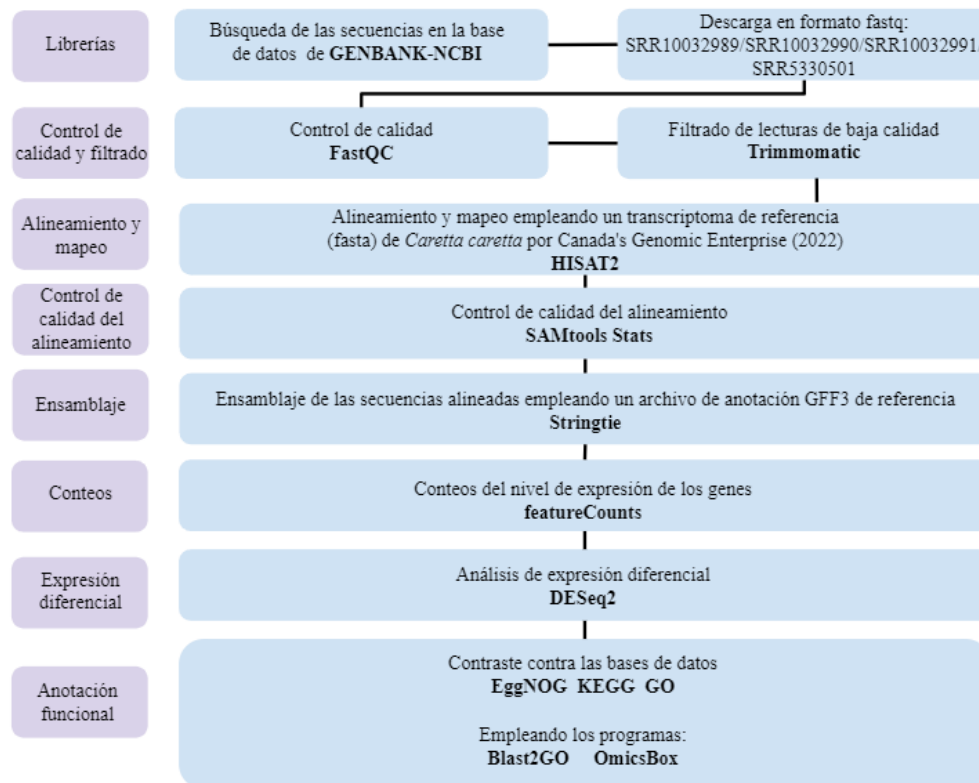


Figura 1. Esquema de los métodos utilizados en el estudio. Para el análisis se obtuvieron los transcriptomas de dos adultos y dos juveniles de la tortuga caguama (*Caretta caretta*) de la base de datos del NCBI. Las secuencias se evaluaron y filtraron, posteriormente las lecturas se alinearon y ensamblaron. Se determinaron los genes expresados diferencialmente y se realizó la anotación funcional contrastando contra tres bases de datos.

RESULTADOS

Filtrado de las lecturas y control de calidad

Para la identificación de los genes expresados diferencialmente entre las etapas adulta y juvenil de las tortugas caguama, se obtuvieron las secuencias de cuatro librerías ($n = 4$, dos réplicas por condición) (Hernández-Fernández *et al.*, 2021), las cuales mostraron una alta calidad después del filtrado de acuerdo con el análisis de FastQC (Figura 2). Todas las lecturas presentaron un Q-Score superior a 37, que corresponde a una probabilidad de error de 0.0001 (Raymond *et al.*, 2012; Andrews, 2018), con una reducción mínima en el número de secuencias en cada una de las muestras después del filtrado, eliminando menos del 1.11 % del total de las lecturas (Tabla 1).

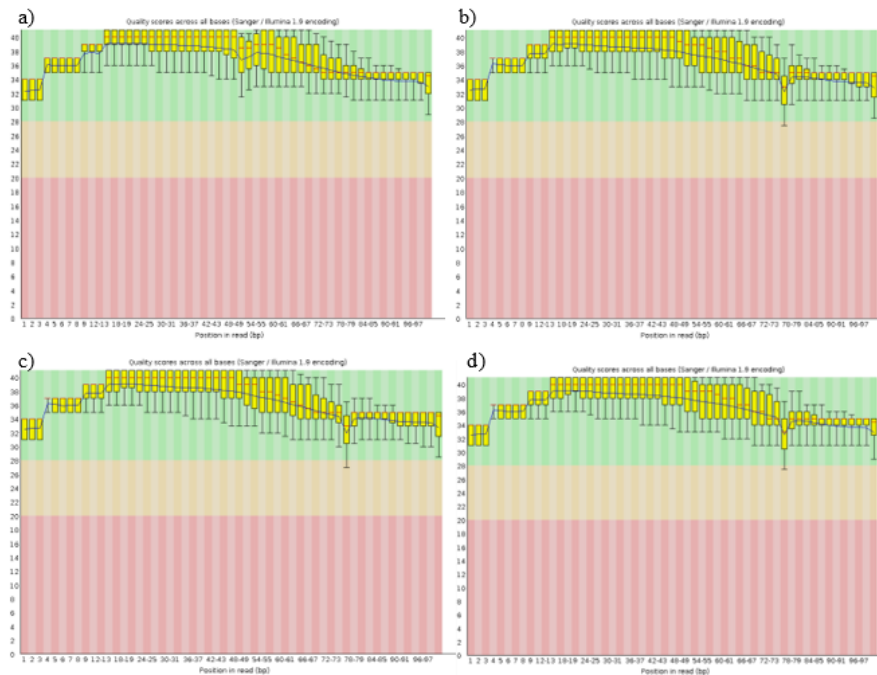


Figura 2. Gráfico de calidad por secuencia de bases después de filtrado de datos NGS con Trimmomatic. En cada uno de los gráficos el eje X representa la posición en la lectura (bp), el eje Y los puntajes de calidad a través de las bases, determinados con el programa FastQC. a) Control de calidad secuencia: Adulto 1, b) Control de calidad secuencia: Adulto 2, c) Control de calidad secuencia: Juvenil 1 y d) Control de calidad secuencia: Juvenil 2.

Tabla 1. Características de las secuencias antes y después del filtrado con Trimmomatic (n = 4) medidas a través de FastQC.

Muestra	%GC	Longitud de la secuencia	Total lecturas pre-filtrado	Total lecturas post-filtrado	Secuencias eliminadas	Secuencias de baja calidad
Adulto 1	50	101 bp	57 001 672	56 371 144	630 528	0
Adulto 2	50	101 bp	54 996 244	54 439 538	556 706	0
Juvenil 1	52	101 bp	49 454 540	48 925 432	529 108	0
Juvenil 2	51	101 bp	53 653 698	53 110 218	543 480	0

Alineamiento y Mapeo

Las muestras presentaron una calidad media aproximada de 37 (SAMtools Stats), que representa la probabilidad de calidad del mapeo, y un porcentaje de lecturas correctamente alineadas y mapeadas al transcriptoma de referencia superior al 84 % en todos los casos (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las secuencias mapeadas y alineadas con HISAT2 (n = 4) medidas a través de SAMtools Stats.

Muestra	Lecturas preprocesamiento	Lecturas mapeadas y emparejadas	Lecturas MQ0	Calidad media	Tasa de error	Secuencias correctamente emparejadas (%)
Adulto 1	56 371 144	49 709 332	717 425	36.6	1.65E+03	87.1 %
Adulto 2	54 439 538	46 597 566	764 119	36.7	1.66E+03	84.5 %
Juvenil 1	48 925 432	44 176 164	477 678	36.5	1.50E+03	88.8 %
Juvenil 2	53 110 218	477 276 338	597 933	36.6	1.56E+03	88.0 %

Análisis de expresión diferencial

De los 13406 transcritos del ensamblaje general de los cuatro transcriptomas, 1401 presentaron una expresión diferencial significativa entre los estadios (p -valor ajustado < 0.05), con 507 genes regulados al alza (\log_2 fold-change ≥ 1) y 894 regulados a la baja (\log_2 fold-change ≤ -1) de la comparación Adulto-Juvenil (Figura 3). La estimación de los niveles de expresión se determinó a través de la cuantificación de las lecturas mapeadas, generando conteos que corresponden a características genómicas, como genes o exones (Liao *et al.*, 2014). Únicamente 563 transcritos fueron asignados a genes, de los cuales 464 corresponden a genes únicos, dado algunos genes como *CA3* o *HAI1F* presentaron variantes de transcripción que se están expresando diferencialmente. La dispersión de los datos (Figura 4), mostró la variabilidad entre las réplicas en función de la media de conteos normalizados, determinando un análisis óptimo.

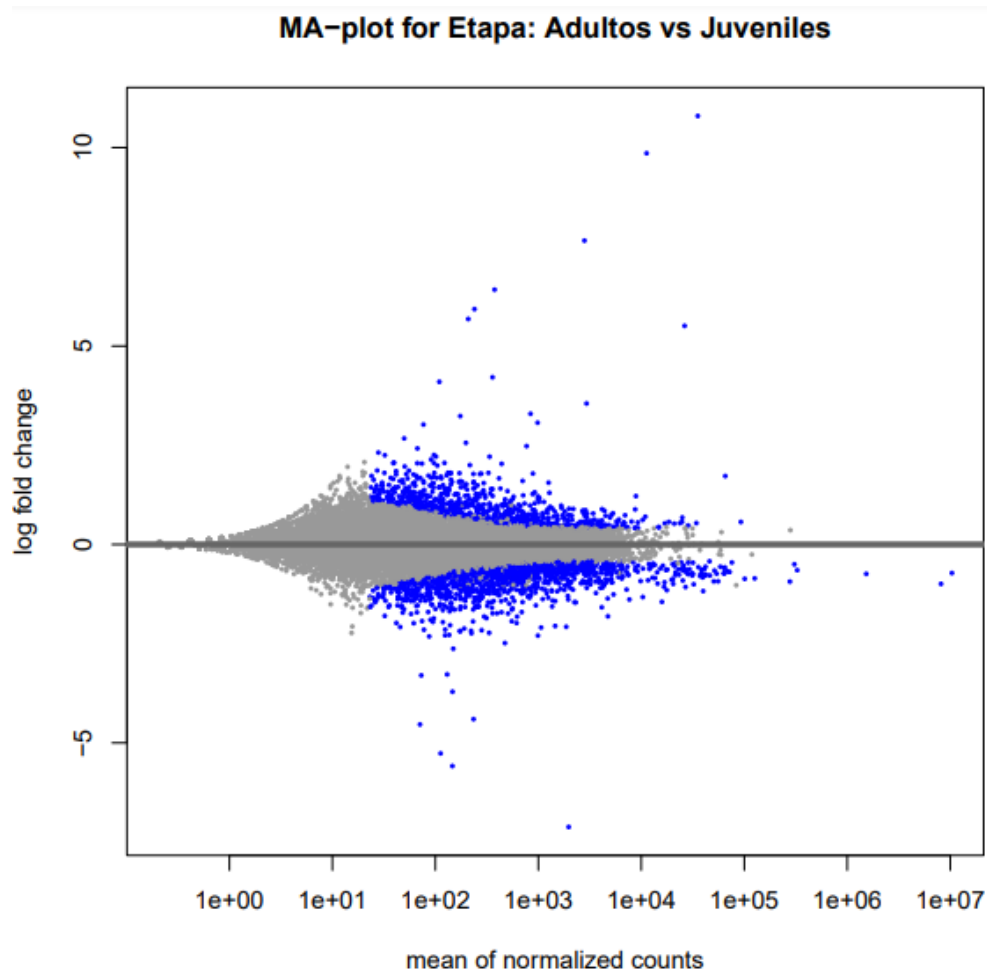


Figura 3. MA-plot a partir del análisis de expresión diferencial entre las condiciones Adulto-Juvenil. En el eje X la media de conteos normalizados, y en el eje Y el log fold-change. Mostrando con puntos de color azul los DEG. Arriba de la línea demarcada en el 0 del eje Y, aquellos genes expresados al alza y debajo de la línea los genes expresados a la baja.

Tabla 3. Ontología génica de los DEG discutidos y datos cuantitativos del análisis de expresión diferencial Adultos versus Juveniles. Genes expresados al alza ($\log_2(\text{FC}) \geq 1$) y genes expresados a la baja ($\log_2(\text{FC}) (\leq -1, p\text{-aj} < 0.05)$).

Función	Gen	$\log_2(\text{FC})$	P-valor ajustado	Código en NCBI
Respuesta al estrés oxidativo	CA3 v.3	9.85743733	2.82×10^{-243}	XM_048841119.1
	CA3 v.5	5.50815374	1.39×10^{-30}	XM_048841121.1
	CA3 v.6	10.796191	1.27×10^{-138}	XM_048841122.1
	CA3 v.4	7.65590117	7.90×10^{-145}	XM_048841120.1
	CA3 v.7	5.93032936	1.47×10^{-45}	XM_048841123.1
	CA3 v.8	5.68079618	3.88×10^{-40}	XM_048841124.1
Respuesta inmune	HAI1F v.1	1.73192648	9.96×10^{-5}	XM_048834979.1
	HAF1 v.5	3.5521874	9.32×10^{-61}	XM_048817648.1
	FAU	4.09846558	3.95×10^{-20}	XM_048859325.1
	CR1	1.98755483	6.10×10^{-7}	XM_048827036.1
	H2AJ	1.80337016	2.25×10^{-5}	XM_048835386.1
	CCL17	1.44294534	0.00048	XM_048816614.1
Metabolismo de carbohidratos	IDH2	-1.4260137	1.83E-06	XM_048865892.1
	ANGPTL4	-2.965117	0.00033267	XM_048831150.1
	HYI	-1.65598916	4.50×10^{-5}	XM_048862036.1
	GPR27	-1.17982055	0.00021369	XM_048858780.1
Respuesta a la hipoxia	IGF1R	1.16617505	7.79×10^{-5}	XM_048865751.1
	ARNTL2	1.56620542	0.00314837	XM_048825875.1
	NKX3-1	1.773289	0.04725715	XM_048829116.1
Respuesta a xenobióticos	CD69	-1.2113598	0.00312504	XM_048834955.1
	CMBL	-2.255517	0.02693189	XM_048839571.1
	ETHE1	-2.231698	0.03033232	XM_048827828.1

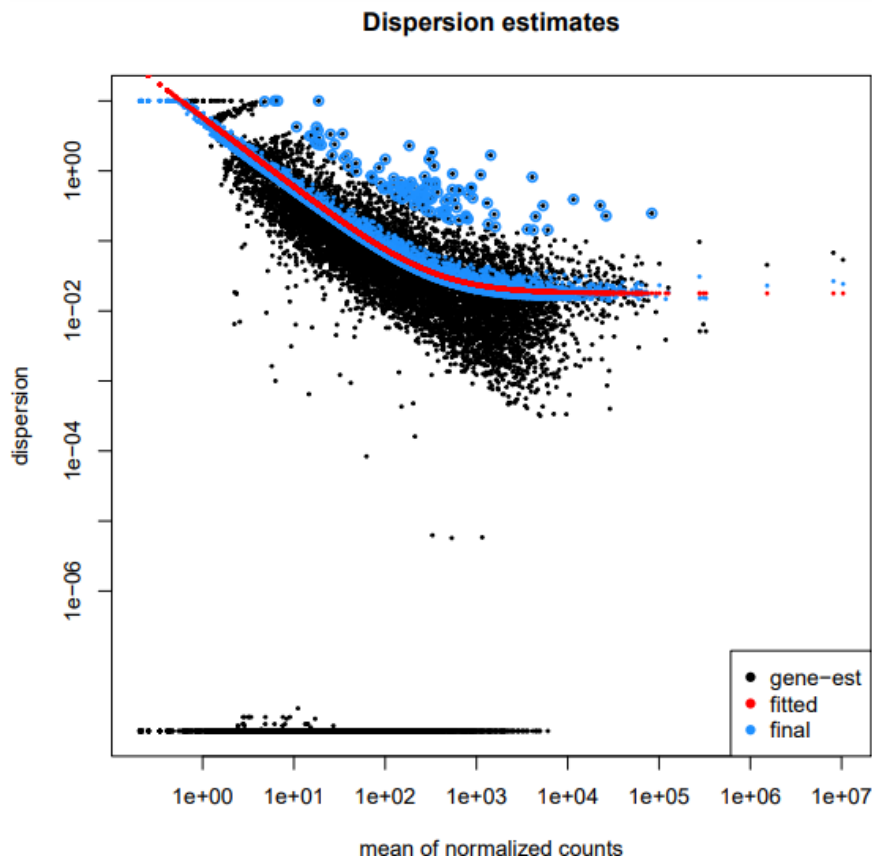


Figura 4. Gráfico de la dispersión estimada de los datos empleados en el análisis de expresión diferencial con DESeq2. En el eje X la media de conteos normalizados y en el eje Y la variabilidad. Cada uno de los puntos negros corresponde a un gen, los puntos azules corresponden a los genes normalizados y la línea roja es una curva ajustada de la dispersión de los genes expresados.

En el mapa de calor (Figura 5) se evidencia el contraste que existe en el nivel de expresión de los DEG discutidos en el presente estudio, comparando las réplicas de las dos condiciones, con similitudes entre las réplicas de cada condición; Por ejemplo, al observar el nivel de expresión génica del Adulto 1 vs. Adulto 2, se observa como existen similitudes entre ellas a través de la escala de color y como ambas a su vez se diferencian de las réplicas de la condición Juvenil (Juvenil 1 y Juvenil 2). Asimismo, la variación en la escala de colores exhibe los genes que presentan una mayor expresión en cada una de las condiciones.

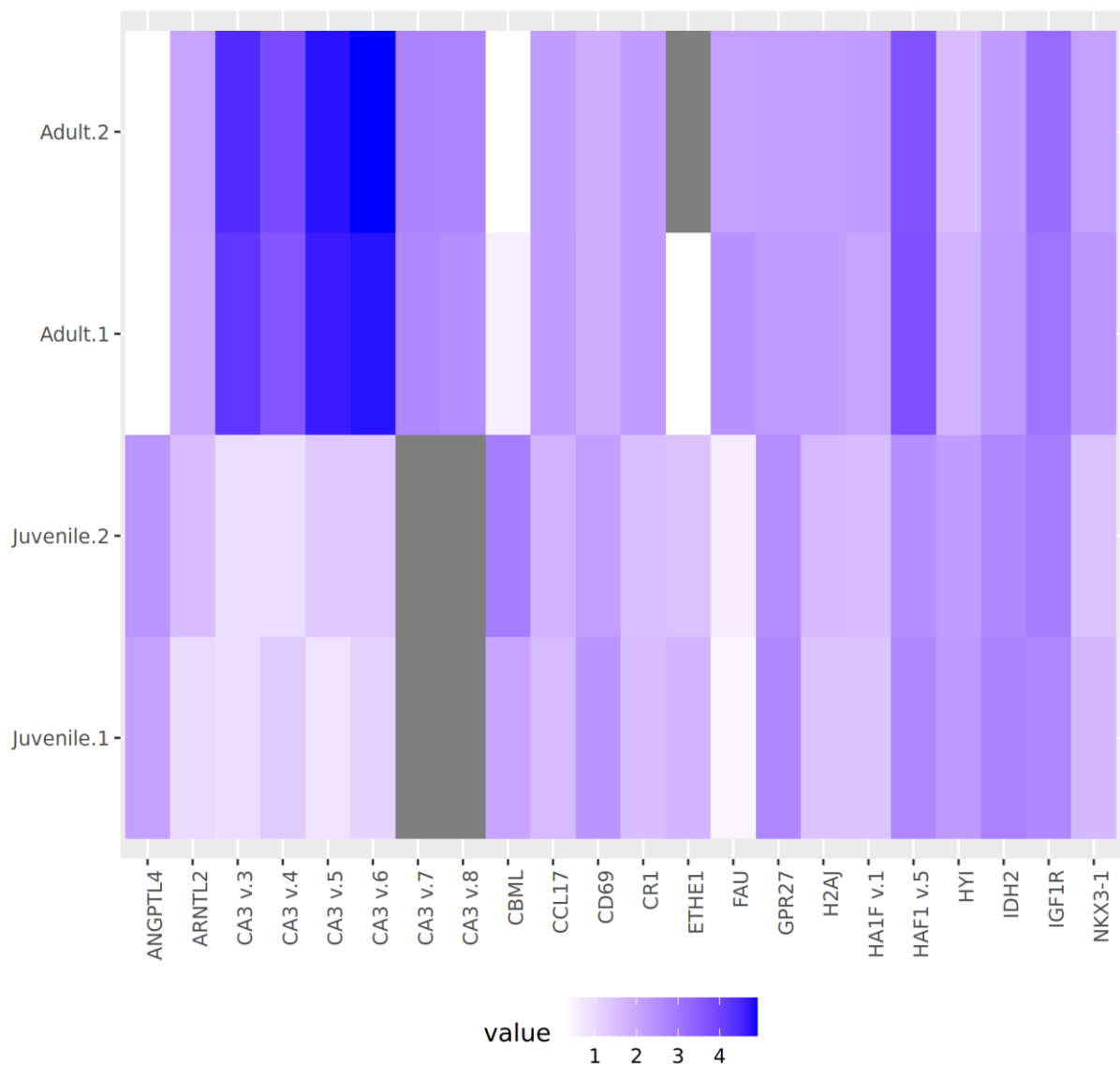


Figura 5. Mapa de calor que compara el nivel de expresión de los DEG discutidos, teniendo en cuenta cada muestra (n = 4). Los genes están identificados en el eje X con el nombre del gen. La escala de colores que se muestra en la parte inferior denominada “value” ilustra el nivel de expresión (conteos normalizados).

Anotación funcional

Se anotaron el 40 % de los genes expresados diferencialmente y se identificaron 8252 términos GO para procesos biológicos (65.3 %), funciones moleculares (15.7 %) y componentes celulares (19.0 %) (Figura 6) y 583 rutas de referencia de la ontología KEGG (KO) de los 563 genes que se lograron anotar funcionalmente. Estos datos se redujeron a categorías más amplias con la finalidad de facilitar la interpretación (Figura 7), en donde la categoría más enriquecida fue la relacionada con procesos celulares (30.5 %), seguida por la respuesta inmunológica, (11.4 %), destacándose otras categorías como la respuesta al estrés oxidativo (6.54 %) y los genes asociados a la respuesta a xenobióticos (6.30 %) y el metabolismo de carbohidratos (3.00 %) de los cuales se extrajeron los genes discutidos (Tabla 3).

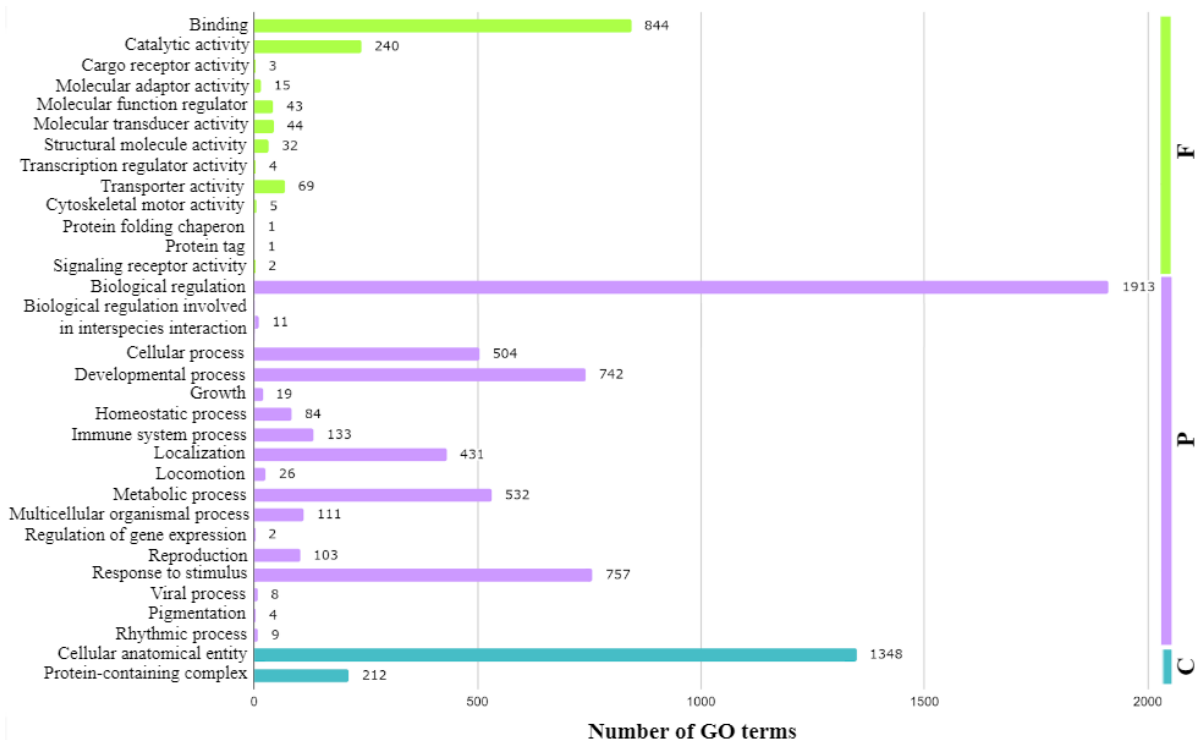


Figura 6. Distribución de la clasificación de los 8252 términos GO obtenidos de la anotación funcional realizada a partir de los DEG de la comparación Adultos vs. Juveniles de tortuga la caguama (*Caretta caretta*). Los términos se clasificaron en las tres categorías de GO: (P) Proceso biológico, (C) Componente celular, (F) Función molecular.

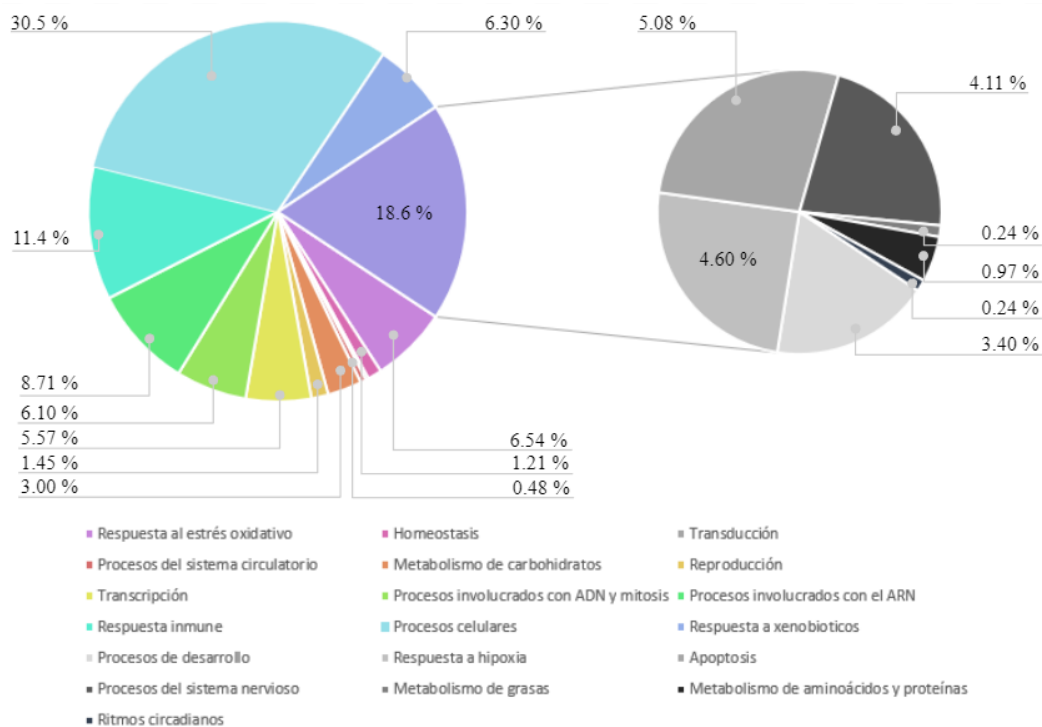


Figura 7. Análisis de anotación funcional de los 563 DEG anotados funcionalmente. Las categorías en la parte inferior corresponden a las funciones que se determinaron según los términos GO y las rutas de referencia de la ontología KEGG.

DISCUSIÓN

En este estudio se realizó la primera identificación de genes expresados diferencialmente entre adultos y juveniles de la tortuga caguama, mediante un análisis de expresión diferencial realizado a partir de secuencias de un estudio previo (Hernández-Fernández *et al.*, 2021). Las secuencias tuvieron una alta calidad, con un Q-Score superior a 34 (Robin *et al.*, 2016), que removi6 menos del 1.1 % de las secuencias iniciales (Tabla 1). Se alinearon y mapearon correctamente más del 84 % de las lecturas (Tabla 2), lo que implica que una gran proporción de las lecturas están en una orientación adecuada y tienen el tamaño de inserción en la alineación con el transcriptoma de referencia (Thankaswamy *et al.*, 2017). Se identificaron 1401 genes expresados diferencialmente ($p\text{-aj} < 0.05$) de los 13406 transcritos identificados en el ensamblaje general (Figura 3), logrando anotar 563 de los DEG (Figura 7), destacándose genes clasificados en diferentes categorías tales como: respuesta al estrés oxidativo, respuesta a la hipoxia y respuesta inmunológica (Tabla 3).

El nivel de expresión significativamente mayor de las siete variantes isoenzimáticas de la anhidrasa carbónica 3 (CA3) en la condición adulta (Tabla 3), puede estar respondiendo a mecanismos relacionados con la protección al estrés oxidativo (Chegwidden y Carter, 2000), dada la presencia de grupos tiol libres y su capacidad para sufrir glutatiónilación, desempeñando un papel en la respuesta al envejecimiento a través de la protección al estrés oxidativo, protegiendo a los organismos aerobios de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kim y Levine, 2005). En investigaciones previas la expresión de CA3 en células del núcleo pulposo de ratas wistar (*Rattus norvegicus*), han sugerido el mantenimiento de los niveles de la proteína CA3 S-glutatiónilada, como estrategia potencial para combatir los efectos del estrés oxidativo involucrado en procesos de envejecimiento (Silagi *et al.*, 2018). En estudios realizados en aves y reptiles, se determinó que las especies más longevas suelen presentar mitocondrias más eficientes y una mayor capacidad antioxidante, mostrando que especies con una historia de vida longeva presentan una resistencia mayor al daño oxidativo y la senescencia (Ku, *et al.* 1993; Lambert *et al.*, 2007; Hoekstra *et al.*, 2020), aspectos que se explican en la "teoría de los radicales libres del envejecimiento" (Harman, 1956; Speakman *et al.*, 2015).

El alto nivel de expresión de las variantes de transcripción de CA3 en los adultos de la tortuga caguama también puede estar asociada con la respuesta a la hipoxia (Wykoff *et al.*, 2000), puesto que la expresión de CA3 ha sido relacionada con mecanismos moleculares de tolerancia a la anoxia, en donde las anhidrasas carbónicas participan en el intercambio de gases durante la respiración produciendo un tiempo de transferencia del CO₂ más corto relacionado con una alta eficiencia de intercambio de CO₂ - O₂, necesaria durante la exposición a la hipoxia, considerándose este proceso como un mecanismo de adaptación (Wykoff *et al.*, 2000; Potter y Harris, 2004). En las especies de tortugas marinas, este mecanismo adaptativo está relacionado con el buceo, puesto que las tortugas caguama permanecen

sumergidas de siete a ocho horas aproximadamente, en las cuales el organismo soporta cambios sustanciales en los niveles de pH y gases en sangre (Lutz y Bentley, 1985; Hochscheid *et al.*, 2007a; Hawkes *et al.*, 2007), y la anhidrasa carbónica podría estar desempeñando un papel en los intercambios de iones y la regulación del pH intra y extracelular (Supuran, 2016). La hipótesis de la actividad de *CA3* como gen implicado en los mecanismos adaptativos a hipoxia, también puede soportarse a través de la expresión al alza en los adultos de las tortugas de otro de los genes anotados con esta función, el gen *NKX3-1* (\log_2 (FC) = 1.77, [p = 0.0473] [Adulto-Juvenil]), dado que algunos autores han sugerido que genes como *NKX3-1*, *EST1*, *STAT3* y *TWIST1* los cuales se relacionan con factores de transcripción sensibles a la hipoxia, conservan motivos de unión en especies como *R. norvegicus* y promotores en *H. sapiens*, regulando la expresión de *CA3* de manera individual o conjunta en respuesta a esta condición (Silagi *et al.*, 2018).

Otros genes anotados relacionados con procesos de respuesta a hipoxia, el nivel de expresión fue en todos los casos significativamente mayor en los adultos de la tortuga caguama, esta diferencia se debe a que las tortugas en esta etapa poseen una capacidad de buceo superior, comparada con la capacidad que presentan en el estadio juvenil, teniendo en cuenta que la duración de la inmersión aumenta con el tamaño del cuerpo y la edad (van Dam y Diez, 1997; Hochscheid *et al.*, 2007b). Específicamente el gen *ARNTL2* (\log_2 (FC) = 1.56, [p = 0.0031] [Adulto-Juvenil]), está relacionado con proteínas reguladoras centrales importantes en el mantenimiento de los ritmos circadianos y en la hipoxia inducible, asociada con la adaptación a bajos niveles de oxígeno (Gu *et al.*, 2000), tal y como se determinó en la anotación funcional. En contraste, en el caso del gen *IGFIR* (\log_2 (FC) = 1.16, [p = 7.79×10^{-5}] [Adulto-Juvenil]), estudios en peces cebra, han mostrado que el factor inducible por hipoxia (HIF) promueve la transcripción de *IGFBP1*, restringiendo la activación de *IGFIR* (Kamei, 2020), mientras que en los humanos se ha reportado un rol crítico en la supervivencia de las células después de hipoxia o estrés oxidativo (Denley *et al.*, 2004; Sparkman *et al.*, 2012). Aún no se han precisado con exactitud los mecanismos mediante los cuales el gen *IGFIR* funciona en algunos reptiles, incluyendo a las tortugas marinas. *IGFIR* en conjunción con *IRS*, reclutan enzimas de señalización clave en las vías *PI3K* y *MAPK*, señales que se traducen para la activación de actividades celulares que controlan el metabolismo, la maduración y el envejecimiento (Kamei, 2020). Otros estudios presentaron que en *Myotis brandtii*, los cambios específicos en *IGFIR* derivan en la extensión de su esperanza de vida (Seim *et al.*, 2013). Lo cual coincide con algunas de las funciones con las que *IGFIR* se identificó en el presente estudio mediante la anotación funcional, relacionándolo con procesos como el envejecimiento y la regulación negativa de vías de señalización apoptótica. Esta hipótesis también es respaldada por Schwartz y Bronikowsk (2016), que explicaron que la expresión de *IGFIR* está relacionada con la supervivencia celular y la longevidad, a través de la activación de *FOXO*, con evidencias iniciales en *Caenorhabditis elegans*, indicando que la familia *FOXO* es un objetivo clave aguas abajo de la vía *PI3K-Akt* en la

longevidad (Lin *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997), mecanismo más probable por el cual esté actuando, dada la expresión al alza del gen en estadios adultos de la tortuga caguama en este estudio.

En contraste, los genes que se relacionaron en la anotación funcional con el metabolismo de carbohidratos *ANGPTL4* (\log_2 (FC) = -2.96, [p = 0.0003] [Adulto-Juvenil]), *HYI* (\log_2 (FC) = -1.65, [p = 4.5×10^{-5}] [Adulto-Juvenil]), *IDH2* (\log_2 (FC) = -1.42, [p = 1.8×10^{-6}] [Adulto-Juvenil]) y *GPR27* (\log_2 (FC) = -1.17, [p = 0.0002] [Adulto-Juvenil]), presentaron un mayor nivel de expresión en la etapa juvenil, es probable que estén asociados con vías de tolerancia a la anoxia, puesto que se ha demostrado que las vías implicadas con el metabolismo de carbohidratos en las tortugas se presentan como respuesta a condiciones de anoxia, debido a que la optimización de la respuesta metabólica es importante durante la anaerobiosis, en donde la energía de la glucólisis anaeróbica es crítica para establecer y mantener el estado hipometabólico (Milton, 1994; Krivoruchko y Storey, 2015). Asimismo, en estudios realizados en otros vertebrados como humanos, se ha identificado a *ANGPTL4* como un gen que presenta un incremento en su expresión bajo condiciones de hipoxia, asociado a la vía del factor inducible por hipoxia (HIF) (Heikkilä *et al.*, 2011). De igual modo, Zhang *et al.* (2017) han sugerido la participación de *HYI* en la respuesta a la hipoxia en los vertebrados, debido a la mayor demanda energética de algunos órganos en respuesta a esta condición, en donde el metabolismo de los carbohidratos es necesario para restablecer la homeóstasis, proceso en el que también participa el gen *GPR27*, que se caracteriza por tener un papel importante en la homeostasis de la glucosa (Nath *et al.*, 2020). El gen *IDH2* está involucrado en la vía de la glucólisis en el ciclo del ácido tricarbóxico, se ha descrito, en vertebrados marinos una expresión al alza de *IDH2* en condiciones hipóxicas relacionada con la necesidad energética de los tejidos y como mecanismo de aceleración en el intercambio de gases y la circulación sanguínea, manteniendo el equilibrio celular durante la hipoxia (Mu *et al.*, 2020). Por lo que es probable que en la etapa juvenil de las tortugas caguama la tolerancia y adaptación a la hipoxia durante las inmersiones que realizan, opere mediante mecanismos y rutas diferentes a los que se emplean en la etapa adulta, relacionándose principalmente con el metabolismo de los carbohidratos.

La mayoría de los genes que están asociados con respuesta inmunológica presentan un nivel de expresión mayor en los adultos de *C. caretta*, si bien no se han realizado estudios específicos de la relación de estos genes con la respuesta inmune en tortugas marinas, se conoce que la respuesta inmunológica en los vertebrados sufre una serie de cambios a lo largo del ciclo de vida del organismo, en donde regularmente se da una inmunosenescencia, con la disminución de la respuesta inmune a medida que el individuo envejece (Zimmerman *et al.*, 2013). Sin embargo, en cuanto el sistema inmunitario humoral se refiere, en algunas taxa la producción de anticuerpos poli reactivos aumenta con la edad (Frasca *et al.*, 2008); más específicamente en los reptiles, el aumento de los anticuerpos no específicos en forma de anticuerpos naturales (NAb), muestra una relación positiva entre la inmunidad

y la edad dada su respuesta lenta y robusta a los anticuerpos en comparación con otras clases de vertebrados (Ujvari y Madsen, 2011); Lo anterior concuerda con el tipo de respuesta inmune que la anotación funcional determinó para al menos tres de los genes regulados al alza en los adultos dentro de esta categoría, en donde los genes *FAU*, *H2AJ* y *HAI1F*, se relacionaron con términos GO que indicaron funciones y procesos biológicos involucrados con la respuesta inmune humoral antimicrobiana y antibacteriana. En el caso del gen *FAU* (\log_2 (FC) = 4.09, [p = 3.95×10^{-20}] [Adulto-Juvenil]), se ha descrito que en vertebrados como *R. norvegicus*, participa en la respuesta inmunitaria humoral antimicrobiana mediada por péptidos antimicrobianos y en la respuesta de defensa frente a otros organismos (Yu *et al.*, 2014); de manera similar se ha reportado que las variantes pertenecientes a la superfamilia de histonas *H2A*, como *H2AJ* (\log_2 (FC) = 1.80, [p = 2.25×10^{-5}] [Adulto-Juvenil]), en los vertebrados están involucradas en la respuesta inmune humoral, al actuar como péptidos antimicrobianos (Li *et al.*, 2007). Para el caso de *HAI1F* (Antígeno de histocompatibilidad clase I de tipo cadena alfa F10) (*HAI1F* v. 1 \log_2 (FC) = 1.73, [p = 9.96×10^{-5}]) (*HAI1F* v. 5 \log_2 (FC) = 3.55, [p = 9.32×10^{-61}]) [Adulto-Juvenil]), la información disponible es reducida, dado que sus funciones aún no han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, se conoce que la mayoría de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), codifican productos que desempeñan diversos roles dentro de la respuesta inmune (Guillemot *et al.*, 1988), en donde los MHC de la clase I y II se caracterizan por ser vitales en la presentación de los péptidos propios o extraños a las células T (Shiina *et al.*, 2004), además de que se ha reportado que los MHC de la clase I en algunos vertebrados como el salmón atlántico (*Salmo salar*) presentan una actividad asociada a la resistencia a patógenos bacterianos y virales (Lukacs *et al.*, 2007). Por otra parte, genes como *CCL17* (\log_2 (FC) = 1.44, [p = 0.0005] [Adulto-Juvenil]) a pesar de no haber presentado términos GO relacionados con la respuesta inmune humoral en la anotación funcional del presente estudio, investigaciones previas en otros vertebrados, han vinculado la actividad de este gen con la respuesta inmune humoral, en donde la deficiencia de *CCL17* produce una respuesta humoral reducida en ratones (Stutte *et al.*, 2010) siendo un gen de gran importancia en este tipo de respuesta inmune. De la misma manera el gen *CRI* (\log_2 (FC) = 1.99, [p = 6.10×10^{-7}] [Adulto-Juvenil]), también expresado al alza en las tortugas adultas, se encuentra asociado a funciones respectivas a la respuesta inmune humoral, puesto que en estudios realizados en ratones, se ha observado que este tipo de respuesta se ve mejorada por la acción de *CRI*, a través de la modulación de la activación del complemento en varios niveles, desempeñando múltiples funciones en las células inmunitarias (Pappworth *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que la mayoría de los genes anotados con funciones de respuesta inmunológica presentan niveles altos de expresión en etapas adultas de las tortugas caguama, y están específicamente caracterizados como genes involucrados en la respuesta inmune humoral, es probable que exista una relación positiva de la edad y los procesos de envejecimiento con el aumento de la respuesta inmune humoral, tal y como se ha reportado para otras taxa o en especies de tortugas terrestres como *Chelonoidis abingdonii*, en las que se determina a la respuesta inmune como un proceso

clave durante la evolución de la especie a través de los efectos de la longevidad (Zimmerman *et al.*, 2013; Quesada *et al.*, 2019).

Por otra parte y dentro del marco de las diferencias en la respuesta inmunológica a través de las etapas de vida de *C. caretta*, se encontraron genes que la anotación relaciono con funciones asociadas a la respuesta a los xenobióticos, si bien no existe información disponible de las diferencias en el metabolismo de los xenobióticos en los estadios de tortugas marinas, estudios en hígados de rata demostraron la existencia de diferencias en el metabolismo de los xenobióticos entre las etapas de vida, evidenciando una disminución de la capacidad para desintoxicar y transportar sustancias químicas fuera del cuerpo a medida que el organismo envejece (Lee *et al.*, 2008). Respaldando lo evidenciado para las tortugas caguama en la presente investigación, mostrando en los juveniles de *C. caretta* una mayor expresión de genes anotados con este tipo de funciones, como en el caso del gen *CD69* (\log_2 FC = -1.21, [p = 0.0031] [Adulto-Juvenil]), el cual se relaciona con la mediación de las células inmunitarias, la exportación de los timocitos maduros y como marcador de activación de las células T, además de ejercer un rol en procesos proinflamatorios (Marzio *et al.*, 1999; Sancho *et al.*, 2005). Esta menor expresión en los adultos de las tortugas puede explicarse a través de la evidencia exhibida en algunas investigaciones sobre otros vertebrados, en donde los procesos inflamatorios sufren una desregulación asociada al envejecimiento, con cambios en casi todos los tipos de células del sistema inmunitario, en donde la funcionalidad y el desarrollo de las células T en el timo disminuye a consecuencia de la inmunosenescencia, considerándose su disminución como un reloj inmunológico del envejecimiento (Steinmann, 1986; Wu y Meydani, 2008). Asimismo el gen *CMBL* (\log_2 FC = -2.25, [p = 0.0269] [Adulto-Juvenil]), asociado a la codificación del homólogo de la carboximetilbutenolidasa, conocido como un catalizador de reacciones químicas del tolueno y clorobenceno, así como estar involucrado con la respuesta al daño y reparación del ADN (Schmidt y Knackmuss, 1980; Niu *et al.*, 2012) presentó una expresión al alza en los juveniles de *C. caretta*, posiblemente relacionado con la degradación de compuestos químicos de origen antropogénico que comúnmente afectan a las tortugas marinas, dentro de los cuales se destacan los clorobencenos, dado que compuestos de este tipo como el hexaclorobenceno han sido detectados en órganos como el hígados y el músculo de las tortugas marinas, en especies como *Chelonia mydas* y *Lepidochelys olivacea* (Gardner *et al.*, 2003), representando una posible vía de desintoxicación a este tipo de compuestos en *C. caretta* en su etapa juvenil. De manera similar la expresión al alza del gen *ETHE1* (\log_2 FC = -2.23, [p = 0.0303] [Adulto-Juvenil]) en los juveniles, puede relacionarse con procesos de contaminación, debido a que *ETHE1* tiene una función importante en la degradación del sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Grings *et al.*, 2020) a través de su oxidación utilizando sulfuro: quinona oxidoreductasa (SQR) según lo mostrado por la anotación funcional del presente estudio. En este caso la ruta metabólica a la que la que se debe la sobreexpresión del gen en los juveniles posiblemente corresponda a aquella en la que dos enzimas de SQR se unen al

H₂S reduciendo un disulfuro de cisteína, formando un grupo persulfuro, el cual se transfiere a un sulfuro soluble como la tiorredoxina (Trx) (Olson *et al.*, 2012), en donde la Trx puede estar cumpliendo un papel en la respuesta antioxidante relacionada con una respuesta xenobiótica inducida por el benceno como se ha reportado en ratones (Li *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Se identificaron 464 genes únicos que se expresan diferencialmente entre los adultos y juveniles de las tortugas caguama, vinculados a 5389 tipos de procesos biológicos, 1303 de funciones moleculares y 1560 componentes celulares de acuerdo con los términos GO asignados por la anotación funcional, en donde las categorías más enriquecidas corresponden a la respuesta inmune, la respuesta al estrés oxidativo y el metabolismo de carbohidratos.

La respuesta inmunológica humoral parece mostrar un aumento en su actividad en relación con la edad de las tortugas caguama, presentando niveles de expresión mayores en el estadio adulto comparado con los juveniles, dado que en otras especies de reptiles se ha reportado un aumento de los NAb con la edad, relacionada con un aumento en la respuesta inmune humoral, por lo que es probable opere de manera similar en *C. caretta*. Por el contrario, la respuesta a xenobióticos parece ser menor en las etapas adultas de las tortugas caguama, probablemente relacionado con procesos de inmunosenescencia, generando una disminución en la capacidad de desintoxicación de sustancias.

La capacidad de buceo superior de los adultos de tortuga caguama se evidencia en el mayor nivel de expresión de genes relacionados con la hipoxia, específicamente de los genes *CA3*, *NKX3-1* y *ARNTL2*, cumpliendo un papel fundamental en las rutas metabólicas relacionadas con la respuesta adaptativa a esta condición. Asimismo, se planteó que los mecanismos mediante los que se genera la tolerancia a los bajos niveles de oxígeno durante las inmersiones parece variar entre estadios, en donde la tolerancia a la anoxia en los juveniles estaría principalmente mediada a través de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos.

Se propuso una relación importante entre la expresión de los genes *CA3* y *IGF1R* con la longevidad de la especie por su alta expresión en el estadio adulto, además de la función en la protección al estrés oxidativo conocida de *CA3* y la de *IGF1R* en los reptiles asociada con la longevidad y supervivencia celular.

REFERENCIAS

Afgan, E., D. Baker, B. Batut, M. van den Beek, D. Bouvier, M. Čech, J. Chilton, D. Clements, N. Coraor, B. Grüning, A. Guerler, J. Hillman-Jackson, V. Jalili, H. Rasche, N. Soranzo, J. Goecks, J. Taylor, A. Nekrutenko and D. Blankenberg. 2018. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses. *Nucleic Acids Research*. 46(1,2): 537-544 p.

Agarwal A, D. Koppstein, J. Rozowsky, A. Sboner, L. Habegger, L.W. Hillier, R. Sasidharan, V. Reinke, R.H. Waterston and M. Gerstein. 2010. Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *BMC genomics*. 11(1):1 p.

Alvarez, M., A.W. Schrey and C.L. Richards. 2015. Ten years of transcriptomics in wild populations: what have we learned about their ecology and evolution?. *Mol Ecol*. 24(4):710–25 p.

Andrews, S. 2018. FastQC A Quality control tool for high throughput sequence data. Babraham. Bioinfo. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. 7/04/2022.

Banerjee, S.M., J.A. Stoll, C.D. Allen, J.M. Lynch, H.S. Harris, L. Kenyon, R.E. Connon, E.J. Sterling, E. Naro-Maciel, K. McFadden, M.M. Lamont, J. Bengé, N.B. Fernandez, J.A. Seminoff, S.R. Benson, R.L. Lewison, T. Eguchi, T.M. Summers, J.R. Hapdei, M.R. Rice, S. Martin, T. Todd, P.H. Dutton, G.H. Balazs and L.M. Komoroske. 2021. Species and population specific gene expression in blood transcriptomes of marine turtles. *BMC Genomics*. 22: 346 p.

Bentley, B.P., B.J. Haas, J.N. Tedeschi and O. Berry. 2017. Loggerhead Sea turtle embryos (*Caretta caretta*) regulate expression of stress response and developmental genes when exposed to a biologically realistic heat stress. *Molecular ecology*. 26(11): 2978-2992 p.

Block, B.A., I.D. Jonsen, S.J. Jorgensen, A.J. Winship, S.A. Shaffer and S.J. Bograd. 2011. Tracking apex marine predator movements in a dynamic ocean. *Nature*. 475: 86–90 p.

Bolger, A.M., M. Lohse and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. PubMed. 30: 2114–2120 p.

Cásale, P. and A.D. Tucker. 2017. *Caretta caretta* (amended version of 2015 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T3897A119333622. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T3897A119333622.en>. 21/12/2021.

Canada's Genomic Enterprise. 2022. Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) genome sequencing and assembly (Canada's Genomic Enterprise), rCarCar2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_023653815.1/. 25/10/2022.

Chamorro, C. 2019. Análisis de datos de RNA-Seq empleando diferentes paquetes desarrollados dentro del proyecto Bioconductor para estudios de expresión génica diferencial. Creative Commons. 74 p.

Cocci, P., M. Capriotti, G. Mosconi and F.A. Palermo. 2017. Effects of endocrine disrupting chemicals on estrogen receptor alpha and heat shock protein 60 gene expression in primary cultures of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) erythrocytes. Environmental Research. 158: 616-624 p.

Cocci, P., G. Mosconi, L. Bracchetti, J.M. Nalocca, E. Frapiccini, M. Marini, G. Caprioli, G. Sagratini and F.A. Palermo. 2018. Investigating the potential impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on gene biomarker expression and global DNA methylation in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Adriatic Sea. Science of The Total Environment. 619–620: 49-57 p.

Cocci, P., G. Mosconi and F.A. Palermo. 2022. Organic UV Filters Induce Toll-like-Receptors and Related Signaling Pathways in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Juvenile Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). Animals. 12(5): 594 p.

Chow, J.C., N. Kyritsis, M. Mills, M.H. Godfrey, C.A. Harms, P.E. Anderson and A.M. Shedlock. 2021. Tissue and Temperature-Specific RNA-Seq Analysis Reveals Genomic Versatility and Adaptive Potential in Wild Sea Turtle Hatchlings (*Caretta caretta*). Animals. 11: 3013 p.

Chegwidden, WR. and N.D. Carter. 2000. Introduction to the carbonic anhydrases. EXS. 90: 13-28 p.

Conesa, A., S. Götz, J.M. García-Gómez, J. Terol, M. Talón and M. Robles. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics. 21(18): 3674-3676 p.

Denley, A., E.R. Bonython, G.W. Booker, L.J. Cosgrove, B.E. Forbes, C.W. Ward and J.C. Wallace. 2004. Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to

insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Molecular Endocrinology*. *18(10)*: 2502–2512 p.

Dolmán, A.J. 1990. “The Potential Contribution of Marine Resources to Sustainable Development in Small-Island Developing Countries”, in Beller, W., P. D'Ayala and P. Hein, (Eds), *Sustainable Development and Environmental Management of Small Islands. Man and the Biosphere Series. Volume 5.* UNESCO, Paris, and Parthenon Publishing Carnforth.

Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly. 2000. *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo especialista en Tortugas Marinas. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Comisión de Supervivencia de Especies. 4: 270 p.*

Frasca, D., A.M. Landin, R.L. Riley and B.B. Blomberg. 2008. Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *J. Immunol.* *180*: 2741–2746 p.

Gardner, S.C., M.D. Pier, R. Wesselman and J.A. Juarez. 2003. Organochlorine contaminants in sea turtles from the eastern Pacific. *Marine Pollution Bulletin.* *46*: 1082-1089 p.

Grings, M., M. Wajner and G. Leipnitz. 2020. Mitochondrial dysfunction and redox homeostasis impairment as pathomechanisms of brain damage in ethylmalonic encephalopathy: insights from animal and human studies. *Cellular and Molecular Neurobiology.* *42*: 1-11 p.

Guillemot, F., A. Billault, O. Pourquie, G. Behar, A.M. Chaussé, R. Zoorob, G. Kreibich and C. Auffray. 1988. A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class II beta genes are closely linked to the class I genes and the nucleolar organizer. *The EMBO journal.* *7(9)*: 2775-2785 p.

Gu, Y.Z., J.B. Hogenesch and C.A. Bradfield. 2000. The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annu Rev Pharmacol.* *40*: 519–561 p.

Harman, D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* *11*: 298–300 p.

Hawkes, L.A., A.C. Broderick, M.S. Coyne, M.H. Godfrey and B.J. Godley. 2007. Only some like it hot - quantifying the environmental niche of the loggerhead sea turtle. *Divers. Distrib.* *13*: 447-457 p.

Heikkilä, M., A. Pasanen, K.I. Kivirikko and J. Myllyharju. 2011. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response. *Life Sciences.* *68(23)*: 3885–3901 p.

Hernández-Fernández, J., A. Pinzón, L. and Mariño-Ramírez. 2017. De novo transcriptome assembly of loggerhead sea turtle nesting of the Colombian Caribbean. *Genomics Data.* *13*: 18-20 p.

Hernández-Fernández, J., A.M. Pinzón-Velasco, E.A. López-Barrera, M. Rodríguez-Becerra, J.L. Villanueva-Cañas, M. Alba, L. Mariño-Ramírez. 2021. De novo assembly and functional annotation of blood transcriptome of loggerhead turtle, and in silico characterization of peroxiredoxins and thioredoxins. *PeerJ.* *9*: 32 p.

Hochscheid, S., F. Bentivegna, M.N. Bradai and G.C. Hays. 2007a. Overwintering behaviour in sea turtles: dormancy is optional. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *340*: 287-298 p.

Hochscheid, S., C.R. McMahon, C.J.A. Bradshaw, F. Maffucci, F. Bentivegna and G.C. Hays. 2007b. Allometric scaling of lung volume and its consequences for marine turtle diving performance. *Comp Biochem Physiol A.* *148*: 360–367 p.

Hoekstra, L.A., T.S. Schwartz, A.M. Sparkman, D.A.W. Miller and A.M. Bronikowski. 2020. The untapped potential of reptile biodiversity for understanding how and why animals age. *Funct Ecol.* *34*: 38– 54 p.

Iverson, A.R., I. Fujisaki, M.M. Lamont and K.M. Hart. 2019. Loggerhead Sea turtle (*Caretta caretta*) diving changes with productivity, behavioral mode, and sea surface temperature. *PloS one.* *14(8)*: 19 p.

Kamei, H. 2020. Oxygen and embryonic growth: the role of insulin-like growth factor signaling. *General and Comparative Endocrinology.* *294*: 113473 p.

Keller, J.M., J.R. Kucklick, M.A. Stamper, C.A. Harms and P.D. McClellan-Green. 2004. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environ. Health Persp.* *112*: 1074-1079 p.

Keller, J.M., P.D. McClellan-Green, A.M. Lee, M.D. Arendt, P.P. Maier, A.L. Segars, J.D. Whitaker, D.E. Keil and M.M. Peden-Adams. 2005. Mitogen-induced lymphocyte proliferation in loggerhead sea turtles: comparison of methods and effects of gender, plasma testosterone concentration, and body condition on immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *103*: 269-281 p.

Keller, J.M., P.D. McClellan-Green, J.R. Kucklick, D.E. Keil and M.M. Peden-Adams. 2006. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. *Environ. Health. Persp.* *114*: 70-76 p.

Kim, G. and R. Levine. 2005. Molecular determinants of S-glutathionylation of carbonic anhydrase 3. *Antioxidants and Redox Signalling.* *7*: 849-854 p.

Kim, D., B. Langmead and S.L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods.* *12(4)*: 357-360 p.

Krivoruchko, A. and K.B. Storey. 2015. Turtle anoxia tolerance: biochemistry and gene regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* *1850(6)*: 1188-1196 p.

Kovaka, S., A.V. Zimin, G.M. Pertea, R. Razaghi, S.L. Salzberg and M. Pertea. 2019. Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Biology.* *20(1)*: 1-14 p.

Ku, H.H., U.T. Brunk and R.S. Sohal. 1993. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen-peroxide production and longevity of mammalian-species. *Free Radical Biology and Medicine.* *15*: 621-627 p.

Lambert, A.J., H.M. Boysen, J.A. Buckingham, T. Yang, A. Podlutzky, S.N. Austad and M.D. Marca. 2007. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell.* *6*: 607-618 p.

Lapennas, G.N. and P.L. Lutz. 1982. Oxygen affinity of sea turtle blood. *Respiration physiology.* *48(1)*: 59-74 p.

Lee, J.S., W.O. Ward, D.C. Wolf, J.W. Allen, C. Mills, M.J. DeVito and J.C. Corton. 2008. Coordinated Changes in Xenobiotic Metabolizing Enzyme Gene Expression in Aging Male Rats. *Toxicological Sciences.* *106(1)*: 263-283 p.

Lin, K., J.B. Dorman, A. Rodan and C. Kenyon. 1997. *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 278(5341): 1319-1322 p.

Li, G.X., Y. Hirabayashi, B.I. Yoon, Y. Kawasaki, I. Tsuboi, Y. Kodama, Y. Kurokawa, J. Yodoi, J. Kanno and T. Inoue. 2006. Thioredoxin overexpression in mice, model of attenuation of oxidative stress, prevents benzene-induced hemato-lymphoid toxicity and thymic lymphoma. *Exp Hematol*. 34(12): 1687-1697 p.

Li, C., L. Song, J. Zhao, L. Zhu, H. Zou, H. Zhang, H. Wang and Z. Cai. 2007. Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology*. 22(6): 663-672 p.

Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis and R. Durbin. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25(16): 2078-2079 p.

Liao, Y., G.K. Smyth and W. Shi. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 30(7): 923-930 p.

Love, M.I., W. Huber and S. Anderson. 2014. Moderated estimation of fold changes and dispersion of RNA-Seq data with DESeq. *Genome Biol*. 15(12): 550 p.

Lutz, P.L. and T.B. Bentley. 1985. Respiratory Physiology of Diving in the Sea Turtle. *Copeia*. 1985(3): 671-679 p.

Lutcavage, M.E., P.G. Bushnell and D.R. Jones. 1990. Oxygen transport in the leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea*. *Physiol. Zool*. 63: 1012-1024 p.

Lukacs, M.F., H. Harstad, U. Grimholt, M. Beetz-Sargent, G.A. Cooper, L. Reid, H.G. Bakke, R.B. Phillips, K.M. Miller, W.S. Davidson and B.F. Koop. 2007. Genomic organization of duplicated major histocompatibility complex class I regions in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC genomics*. 8(1): 1-16 p.

Marco, A., C. Carreras y E. Abella. 2008. Tortuga boba – *Caretta caretta*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L. M., Salvador, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>.

Marzio, R., J. Mauël and S. Betz-Corradin. 1999. CD69 and Regulation of the Immune Function. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 21(3): 565-582 p.

Mayne, B., A.D. Tucker, O. Berry y S. Jarman. 2020. Lifespan estimation in marine turtles using genomic promoter CpG density. *Plos one*. 15(7): 1-8 p.

McDermaid, A., B. Monier, J. Zhao, B. Liu and Q. Ma. 2019. Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Briefings in bioinformatics*. 20: 2044–2054 p.

Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews Genetics*. 11(1): 31-46 p.

Milton, S.L. 1994. The physiology of hypoxia and anoxia tolerance in three species of turtle: the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*), green sea turtle (*Chelonia mydas*), and freshwater *Trachemys scripta*. University of Miami. 175 p.

Mu, Y., W. Li, Z. Wei, L. He, W. Zhang and X. Chen. 2020. Transcriptome analysis reveals molecular strategies in gills and heart of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under hypoxia stress. *Fish & shellfish immunology*. 104: 304-313 p.

Nath, A.K., J. Ma, Z.Z. Chen, Z. Li, M.D.C. Vitery, M.L. Kelley, R.T. Peterson, R.E. Gerszten and J.J. Yeh. 2020. Genetic deletion of *gpr27* alters acylcarnitine metabolism, insulin sensitivity, and glucose homeostasis in zebrafish. *The FASEB Journal*. 34(1): 1546-1557 p.

Niu, N., D.J. Schaid, R.P. Abo, K. Kalari, B.L. Fridley, Q. Feng, G. Jenkins, A. Batzler, A.G. Brisbin, J.M. Cunningham, L. Li, Z. Sun, P. Yang and L. Wang. 2012. Genetic association with overall survival of taxane-treated lung cancer patients -a genome-wide association study in human lymphoblastoid cell lines followed by a clinical association study. *BMC cancer*. 12(1): 1-13 p.

Ogg, S., S. Paradis, S. Gottlieb, G.I. Patterson, L. Lee, H.A. Tissenbaum, and G. Ruvkun. 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*. 389: 994-999 p.

Olson, K.R., J.A. Donald, R.A. Dombkowski and S.F. Perry. 2012. Evolutionary and comparative aspects of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide. *Respiratory physiology & neurobiology*. 184(2): 117-129 p.

Ozsolak, F. and P.M. Milos. 2011. RNA sequencing: advances, challenges, and opportunities. *Nature Rev. Genet.* 12: 87-98 p.

Pappworth, I.Y., C. Hayes, J. Dimmick, B.P. Morgan, V.M. Holers and K.J. Marchbank. 2012. Mice expressing human CR1/CD35 have an enhanced humoral immune response to T-dependent antigens but fail to correct the effect of premature human CR2 expression. *Immunobiology*. 217(2): 147-157 p.

Potter, C. and A.L. Harris. 2004. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumor: hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell cycle*. 3(2): 159-162 p.

Quesada, V., S. Freitas-Rodríguez, J. Miller, J.G. Pérez-Silva, Z.F. Jiang, W. Tapia and C. López-Otín. 2019. Giant tortoise genomes provide insights into longevity and age-related disease. *Nature ecology & evolution*. 3(1): 87-95 p.

Raymond, W., N.A. Vo and A. Kiyoshi. 2012. Transformations for the compression of FASTQ quality scores of next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 28(5): 628-635 p.

Ritchie, M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law y W. Shi. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research*. 43(7): 47 p.

Robinson, M.D., D.J. McCarthy and G.K. Smith. 2010. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26(1): 40-139 p.

Rousselet, E., M. Levin, E. Gebhard, B.M. Higgins, S. DeGuise and C.A. Godard-Coding. 2013. Evaluation of immune functions in captive immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 156(1-2): 43-53 p.

Robin, J.D., A.T. Ludlow, R. LaRanger, W.E. Wright and J.W. Shay. 2016. Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing. *Scientific reports*. 6(1): 1-10 p.

Sancho, D., M. Gómez and F. Sánchez-Madrid. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology*. 26(3): 136-140 p.

Schmidt, E. and H. Knackmuss. 1980. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. *Biochemical Journal*. 192(1): 339-347 p.

Schwartz, T.S. and A.M. Bronikowski. 2016. Evolution and function of the insulin and insulin-like signaling network in ectothermic reptiles: some answers and more questions. *Integrative and Comparative Biology*. 56(2): 171-184 p.

Seim, I., X. Fang, Z. Xiong, A.V. Lobanov, Z. Huang, S. Ma and V.N. Gladyshev. 2013. Genome analysis reveals insights into physiology and longevity of the Brandt's bat *Myotis brandtii*. *Nature communications*. 4(1): 1-8 p.

Shiina, T., H. Inoko and J.K. Kulski. 2004. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens*. 64: 631-649 p.

Silagi, E.S., P. Batista, I.M. Shapiro and M.V. Risbud. 2018. Expression of carbonic anhydrase III, a nucleus pulposus phenotypic marker, is hypoxia-responsive and confers protection from oxidative stress-induced cell death. *Scientific Reports*. 8(1): 1-13 p.

Sparkman, A.M., T.S. Schwartz, J.A. Madden, S.E. Boyken, N.B. Ford, J.M. Serb and A.M. Bronikowski. 2012. Rates of molecular evolution vary in vertebrates for insulin-like growth factor-1 (IGF-1), a pleiotropic locus that regulates life history traits. *General and comparative endocrinology*. 178(1): 164-173 p.

Speakman, J.R., J.D. Blount, A.M. Bronikowski, R. Buffenstein, C. Isaksson, T.B.L. Kirkwood and C. Selman. 2015. Oxidative stress and life histories: Unresolved issues and current needs. *Ecology and Evolution*. 5: S745–S757 p.

Steinmann, G.G. 1986 Changes in the human thymus during aging. *Curr. Top.. Pathol*. 75: 43-88 p.

Storey, K.B. 2007. Anoxia tolerance in turtles: Metabolic regulation and gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 147(2): 263-276 p.

Stutte, S., T. Quast, N. Gerbitzki, T. Savinko, N. Novak, J. Reifenberger, B. Homey, W. Kolanus, H. Alenius and I. Forster. 2010. Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(19): 8736-8741 p.

Supuran, C.T. 2016. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem. J.* 473: 2023–2032 p.

Su, S., C.W. Law, C. Ah-Cann, M.L. Asselin-Labat, M.E. Blewitt and M.E. Ritchie. 2017. Glimma: interactive graphics for gene expression analysis. *Bioinformatics*. 33(13): 2050-2052 p.

Thankaswamy-Kosalai, S., P. Sen and I. Nookaew. 2017. Evaluation and assessment of read-mapping by multiple next-generation sequencing aligners based on genome-wide characteristics. *Genomics*. 109(3-4): 186-191 p.

Tenney, S.M., D. Bartlett, J.P. Farber and J.E. Remmers. 1974. Mechanics of the respiratory cycle in the green turtle (*Chelonia mydas*). *Respiration physiology*. 22(3): 361-368 p.

Teelucksingh, S., S. Eckert and P. Nunes. 2010. Marine turtles, ecosystem services and human welfare in the marine ecosystems of the Caribbean Sea: a discussion of key methodologies. *Études caribéennes*. 15: 2–14 p.

Ujvari, B. and T. Madsen. 2011. Do natural antibodies compensate for humoral immunosenescence in tropical pythons?. *Funct. Ecol.* 25: 813–817 p.

van Dam R.P. and C.E. Diez. 1997. Diving behavior of immature hawksbills (*Eretmochelys imbricata*) in a Caribbean reef habitat. *Coral Reefs*. 16:133–138 p.

Wang, Z., M. Gerstein and M. Snyder. 2009. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Rev. Genet.* 10: 57–63 p.

Wu, D. and S.N. Meydani. 2008. Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. *Journal of leukocyte biology*. *84(4)*: 900-914 p.

Wykoff, C.C., N.J. Beasley, P.H. Watson, K.J. Turner, J. Pastorek, A. Sibtain, G.D. Wilson, H. Turley, K.L. Talks, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe and AL. Harris. 2000. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*. *60*:7075–7083 p.

Yu, Y., J.C. Fuscoe, C. Zhao, C. Guo, M. Jia, T. Qing, D.I. Bannon, L. Lancashire, W. Bao, T. Du, H. Luo, Z. Su, W.D. Jones, C.L. Moland, W.S. Branham, F. Qian, B. Ning, Y. Li, H. Hong, L. Guo, N. Mei, T. Shi, K.Y. Wang, R.D. Wolfinger and C. Wang. 2014. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nature communications*. *5(1)*: 1-11 p.

Zhang, G., J. Zhang, X. Wen, C. Zhao, H. Zhang, X. Li and S. Yin. 2017. Comparative iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of *Pelteobagrus vachelli* Liver under Acute Hypoxia: Implications in Metabolic Responses. *Proteomics*. *17*: 17-18 p.

Zimmerman, L.M., G.S. Clairardin, R.T. Paitz, J.W. Hicke, K.A. LaMagdeleine, L.A. Vogel and R.M. Bowden. 2013. Humoral immune responses are maintained with age in a long-lived ectotherm, the red-eared slider turtle. *Journal of Experimental Biology*. *216(4)*: 633-640 p.

Zmienko, A., P. Jackowiak and M. Figlerowicz. 2011. Transcriptome sequencing: next generation approach to RNA functional analysis. *BioTechnologia*. *Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*. *92(4)*: 311-319 p.