

Análisis e identificación de genes expresados diferencialmente entre juveniles y adultos de la tortuga caguama (*Caretta caretta*) relacionados con hipoxia y sistema inmune: Primera aproximación

Analysis and identification of genes expressed differentially between juveniles and adults of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) related to hypoxia and immune system: First approach

Catalina Rivera-Forero ¹ y Javier Hernández-Fernández ^{1*}

¹Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Cra. 4 No 22-61, Bogotá D.C., Colombia

*Autor corresponsal: genetica0106@gmail.com

Abstract.- The different conditions experienced by *Caretta caretta* during its life cycle, given its longevity and ability to migrate long distances, are reflected in quantitative changes in gene expression at different stages, which can be revealed through transcriptomic analysis. In this study, a differential expression analysis was performed comparing transcriptomes of adult and juvenile turtles, focusing on genes related to hypoxia and immune response. Sequences from nesting turtles under professional care in the Colombian Caribbean were mapped and assembled using reference transcriptomes. Expression levels were quantified for differential analysis and functional annotation was performed. 1,401 differentially expressed genes (DEGs) were identified, with 507 up-regulated and 894 down-regulated in adults. Around 40% of the DEGs were functionally annotated, identifying 8,252 GO terms and 583 reference pathways of the KEGG ontology, highlighting immune response, oxidative stress and carbohydrate metabolism. In adults, hypoxia tolerance seems to be mediated by oxidative stress response genes (*CA3* and *NKX3-1*), while in juveniles it seems to be mediated by carbohydrate metabolism genes (*ANGPTL4*, *HYI* and *IDH*). A higher expression of humoral immune response is observed in adults (*FAU*, *H2AJ* and *HA1F*), and a higher potential to degrade xenobiotic compounds in juveniles (*CD69*, *CMBL* and *ETHE1*). The hypotheses raised based on the function and level of expression of these genes in each stage on the metabolic pathways require specific research that considers variables not evaluated in this study.

Key words: Hypoxia, immune system, transcriptomics, functional annotation, RNA-Seq

Resumen.- Las diferentes condiciones que experimenta *Caretta caretta* durante su ciclo de vida, dada su longevidad y capacidad de migrar grandes distancias, se reflejan en cambios cuantitativos en la expresión de genes en los diferentes estadios, que pueden revelarse a través de análisis transcriptómico. Este estudio analiza la expresión diferencial de genes comparando transcriptomas de tortugas adultas y juveniles, enfocándose en genes relacionados con hipoxia y respuesta inmune. Se usaron secuencias de tortugas bajo cuidado profesional anidantes del Caribe colombiano, mapeadas y ensambladas empleando transcriptoma de referencia. Se cuantificó el nivel de expresión para el análisis diferencial y se realizó anotación funcional. Se identificaron 1.401 genes expresados diferencialmente (DEGs), con 507 sobre-expresados y 894 reprimidos en los adultos. Se anotaron funcionalmente ~40% de los DEGs, identificando 8.252 términos GO y 583 rutas KEGG, destacándose la respuesta inmunológica, el estrés oxidativo y el metabolismo de carbohidratos. En adultos, la tolerancia a hipoxia parece estar mediada por genes de respuesta al estrés oxidativo (*CA3* y *NKX3-1*), mientras que en juveniles parece estar dada a genes de metabolismo de carbohidratos (*ANGPTL4*, *HYI* e *IDH*). Se observa una mayor expresión de respuesta inmunológica humoral en adultos (*FAU*, *H2AJ* y *HA1F*), y un mayor potencial de degradar compuestos xenobióticos en juveniles (*CD69*, *CMBL* y *ETHE1*). Las hipótesis planteadas basadas en la función y nivel de expresión de estos genes en cada estadio sobre las rutas metabólicas requieren investigación específica que considere variables no evaluadas en este estudio.

Palabras clave: Hipoxia, sistema inmune, transcriptómica, anotación funcional, RNA-Seq

INTRODUCCIÓN

La tortuga caguama (*Caretta caretta*, Linnaeus, 1758) es una especie en estado vulnerable (Cásale & Tucker 2017) que tiene la capacidad de mantener e influir en los hábitats donde se distribuye a través de la provisión de bienes y servicios ecosistémicos relacionados con las características de la especie (Marco *et al.* 2008, Teelucksingh *et al.* 2010). La investigación

de estos organismos ha despertado un interés creciente, especialmente en el área de la conservación. Potencialmente representa un organismo modelo para el estudio de 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).



El estudio de los mecanismos adaptativos, anatómicos y fisiológicos relacionados con la capacidad de apnea de las tortugas marinas ha sido de especial interés, dado que permanecen la mayor parte de su vida bajo el agua, a excepción de intervalos en los que ascienden a la superficie para respirar, evitar posibles depredadores, realizar *basking* con la finalidad de absorber radiación solar como estrategia de termorregulación o de reducción de parásitos, y en el caso de las hembras adultas a depositar los huevos durante la temporada reproductiva (Tenney *et al.* 1974, Swimmer 2006, Hochscheid *et al.* 2010, Freitas *et al.* 2019).

Específicamente *C. caretta* se mantiene alrededor del 43% de su tiempo en la superficie durante el día y 29% durante la noche, 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, Freitas *et al.* 2019, Iverson *et al.* 2019). Estos quelónidos poseen un volumen pulmonar máximo entre el 7,9 y 8,9% del peso total corporal, teniendo la capacidad de retener el 72% del oxígeno total calculado en $\sim 22,2 \text{ mL kg}^{-1}$ 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 & Lutz 1982, Lutz & 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 O_2 aumentadas (Lutcavage *et al.* 1990, Milton 1994).

Se han realizado estudios de la regulación metabólica y la expresión génica, asociadas a la tolerancia a la hipoxia, a partir de muestras de tejido cerebral de tortugas de agua dulce de Mississauga, Canadá, pertenecientes a los géneros *Trachemys* Agassiz, 1857 y *Chrysemys* Gray, 1844, encontrando genes sensibles a los bajos niveles de oxígeno, como las subunidades codificadas mitocondrialmente de la cadena de transporte de electrones (Willmore *et al.* 2001), enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa 1 (SOD-1), las isozimas 1 y 4 de la glutatión peroxidasa (GPX), las isozimas M5 y A2 de la glutatión-transferasa (GST) y la peroxiredoxina 1 (Storey 2006a), proteínas de choque como HSP70-1A, HSP70-9B, HSP40 y la α Cristalina (Prentice *et al.* 2004, Ramaglia & Buck 2004), proteínas de almacenamiento de hierro como el receptor de transferrina 2 (TfR2) (Storey 2006a) e inhibidores de serina proteasa como SERPINC1, el cofactor II de la heparina y el factor derivado del epitelio pigmentario o PEDF (Storey 2004, 2006a, 2007). Sin embargo, la expresión génica con relación a la respuesta y tolerancia a la hipoxia en las tortugas marinas aún no ha sido estudiada a profundidad y para el caso de *C. caretta* aún es desconocida.

C. caretta está sometida a diversas presiones a lo largo de su ciclo de vida especialmente relacionadas con extensos movimientos migratorios, enfrentando importantes desafíos ambientales, como la exposición a contaminantes en el medio marino (Keller *et al.* 2004) produciendo una respuesta fisiológica en varios niveles, siendo la del sistema inmunológico altamente relevante. Su estudio a profundidad es crucial para el monitoreo de la salud de esta especie marina en aras de su conservación (Rousselet *et al.* 2013). Si bien se han adelantado investigaciones alrededor de este tema, la mayoría, están enfocados al estudio de la respuesta inmune a enfermedades como: la fibropapilomatosis (Keller *et al.* 2006, Rossi *et al.* 2016, Page-Karjian *et al.* 2020), la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos (Keller *et al.* 2005) o la actividad de las células asesinas naturales (Rousselet *et al.* 2013). De tal manera, queda un vacío asociado al estudio de la expresión génica diferencial de *C. caretta* y la respuesta inmunológica, como también la relación con otros procesos celulares que se presentan en las diferentes etapas de vida de la tortuga.

Asimismo, *C. caretta* atraviesa una serie de cambios en los hábitos a lo largo de su ciclo de vida, abarcando diferentes ecosistemas en cada una de sus etapas de desarrollo (Bolten *et al.* 2003). Los neonatos inician su desarrollo en una fase pelágica, 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 (zona pelágica), 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 maduración tardía (Mayne *et al.* 2020), mostrando diferencias morfológicas entre estadios. 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 bordes aserrados en el caparazón correspondientes a los escudos marginales alcanzando longitudes del caparazón de 28-45 cm, caracteres que cambian a medida que el ejemplar se va aproximando a la madurez sexual, en donde los adultos se diferencian principalmente por exhibir caparazones aplanados con bordes romos de longitudes $>56 \text{ cm}$ y un evidente dimorfismo sexual (Marco *et al.* 2008, Alberghina *et al.* 2015). Estas características específicas de cada estadio, pueden ser la clave para dilucidar aspectos valiosos para la conservación de la especie o para esclarecer los mecanismos y rutas asociados a la longevidad, las adaptaciones a la hipoxia o la defensa contra contaminantes o agentes patógenos en *C. caretta*, a través del estudio de la variación en los perfiles de expresión génica en las diferentes etapas de vida (Alvarez *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 & Milos 2011, Jackowia *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 cuantificación e identificación de la expresión de isoformas y transcripciones desconocidas mediante la secuenciación simultánea de millones de moléculas, otorgando la posibilidad de investigar diferentes transcriptomas a la vez en un tiempo corto, puesto que no implica pasos de clonación y es posible secuenciar el transcriptoma completo de diferentes muestras marcadas con barcodes al mismo tiempo, en contraste con metodologías anteriormente desarrolladas como los análisis en serie de la expresión génica (SAGE), la secuenciación de etiquetas de secuencias expresadas (EST) o los microarrays de ADN (Agarwal *et al.* 2010, Jackowiak *et al.* 2011).

Los estudios con RNA-Seq en *C. caretta*, se han realizado en su gran mayoría a partir de muestras de sangre, abordando aspectos como la genómica funcional (Hernández-Fernández *et al.* 2017, Banerjee *et al.* 2021), la respuesta a contaminantes (Cocci *et al.* 2017, 2018, 2022; Hernández-Fernández *et al.* 2021) o la respuesta a variaciones en la temperatura (Bentley *et al.* 2017, Chow *et al.* 2021). En algunos estudios, en especial en aquellos en donde se comparan tratamientos o la respuesta a condiciones específicas como el estrés térmico o la exposición a contaminantes como metales pesados y compuestos recalcitrantes, se emplea un tipo de análisis basado en la identificación de genes expresados diferencialmente (DEGs) (Metzker 2010, Tedeschi *et al.* 2015, Bentley *et al.* 2017, Cocci *et al.* 2017, 2018, 2022; McDermaid *et al.* 2019, Hernández-Fernández *et al.* 2021).

En este contexto la presente investigación está enfocada en el análisis del transcriptoma de juveniles y adultos de *C. caretta*, con el objetivo de realizar comparaciones de los DEGs entre los dos estadios y de esta manera, discutir los genes que guarden relación con el sistema inmunológico y la hipoxia.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE DATOS

El análisis bioinformático se realizó utilizando la plataforma Galaxy¹ (Afgan *et al.* 2018). Se descargaron las secuencias de extremos pareados (101 pb de longitud) de dos tortugas juveniles y dos adultas de *C. caretta* a partir de muestras obtenidas previamente en Hernández-Fernández *et al.* (2021), en formato fastq del repositorio de datos de Sequence Read Archive (SRA) desarrollado por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando los códigos de acceso (SRR10032989, SRR10032990, SRR10032991 y SRR5330501). Para ello, 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” y se procedió a ejecutar la descarga utilizando los parámetros por defecto.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS LECTURAS

La calidad de los datos transcriptómicos obtenidos se evaluó, utilizando el programa FastQC (Raymond *et al.* 2012, 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 Timmomatic (Bolger *et al.* 2014), este programa se procesó para lecturas de extremos emparejados, seleccionado 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, identificada con el código BioProject: PRJNA826225 (CGEn 2022)². Los datos de referencia se descargaron a través de la herramienta “NCBI Datasets Genomes” dentro del menú

¹ Galaxy source. National Institutes of Health (NIH) - National Human Genome Research Institute (NHGRI). <<https://usegalaxy.org/>>

²CGEn. 2022. Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) genome sequencing and assembly (Canada's Genomic Enterprise), rCarCar2. Accession PRJNA826225. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. Canada's National Platform for Genome Sequencing and Analysis (CGEn) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_023653815.1/>

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 (CGEn 2022)², para la ejecución del ensamblaje manteniendo los parámetros por defecto del programa.

CONTEOS Y NIVEL DE EXPRESIÓN

Una vez obtenidos los transcriptomas ensamblados, se determinó el nivel de expresión de los transcritos, en donde se obtuvieron matrices de conteo correspondientes a genes o exones a través de la cuantificación de las lecturas mapeadas a través del 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 obtenido y los cuatro archivos en formato BAM producto del alineamiento y mapeo de las secuencias de juveniles y adultos de *C. caretta*, a través de la interfaz de featureCounts 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, es decir: a los conteos de la secuencia de código SRR10032991 se designó como “Juvenil 1”, SRR5330501 como “Juvenil 2”, SRR10032989 como “Adulto 1”, y los de SRR10032990 como “Adulto 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 los conjuntos de datos se seleccionaron por nivel, y se le asignó un nombre al factor principal denominado “Estadio”. 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 para el segundo nivel, seleccionando los archivos de conteo de las muestras de los dos juveniles y asignándole el nombre “Juveniles”. Se ejecutó el programa con los parámetros por defecto.

Se obtuvieron los datos cuantitativos, gráficos correspondientes a 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). En la Figura 1 se presenta el esquema general de los métodos usados en este estudio.

RESULTADOS

FILTRADO DE LAS LECTURAS Y CONTROL DE CALIDAD

Para la identificación de los DEGs entre las etapas juvenil y adulta de *C. caretta*, 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. Todas las lecturas presentaron un phred score superior a 37, que corresponde a una probabilidad de error de 0,0001, 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 lecturas (Tabla 1).

ALINEAMIENTO Y MAPEO

Las muestras presentaron una calidad media aproximada de 36,6 (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).

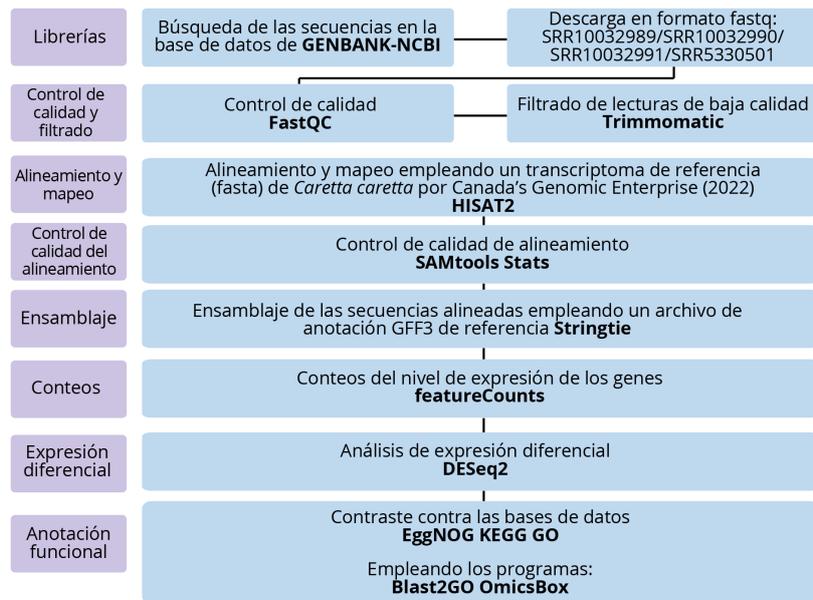


Figura 1. Esquema de los métodos utilizados en el estudio. Para el análisis se obtuvieron los transcriptomas de dos juveniles y dos adultos de la tortuga caguama (*Caretta caretta*) de la base de datos del NCBI. Las secuencias se evaluaron y filtraron, posteriormente las lecturas se alinearon y ensamblaron. Se determinaron los genes expresados diferencialmente y se realizó la anotación funcional contrastando contra tres bases de datos / Scheme of the methods used in the study. For the analysis, the transcriptomes of two juvenile and two adult loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) were obtained from the NCBI database. Sequences were evaluated and filtered, then reads were aligned and assembled. Differentially expressed genes were determined and functional annotation was performed by contrasting against three databases

Tabla 1. Resultados del filtrado de lecturas de baja calidad antes y después, realizado con Trimmomatic (n= 4) cuantificado con FastQC / Results of read trimming of low-quality reads before and after, performed with Trimmomatic (n= 4) quantified with FastQC

Muestra	%GC	Total lecturas pre-filtrado	Total lecturas post-filtrado	Secuencias eliminadas	Secuencias de baja calidad
Adulto 1	50	57.001.672	56.371.144	630.528	0
Adulto 2	50	54.996.244	54.439.538	556.706	0
Juvenil 1	52	49.454.540	48.925.432	529.108	0
Juvenil 2	51	53.653.698	53.110.218	543.480	0

Tabla 2. Resultados del alineamiento y mapeo de lecturas de los transcriptomas de *Caretta caretta* juveniles y adultos realizado con HISAT2 (n= 4) cuantificadas y evaluadas con SAMtools Stats / Results of alignment and mapping of juvenile and adult *Caretta caretta* transcriptome reads performed with HISAT2 (n= 4) quantified and evaluated with SAMtools Stats

Muestra	Lecturas pre-procesamiento	Lecturas mapeadas y emparejadas	Calidad media	Tasa de error	Secuencias correctamente emparejadas (%)
Adulto 1	56.371.144	49.709.332	36,6	1,65×10 ⁻³	87,1
Adulto 2	54.439.538	46.597.566	36,7	1,66×10 ⁻³	84,5
Juvenil 1	48.925.432	44.176.164	36,5	1,50×10 ⁻³	88,8
Juvenil 2	53.110.218	47.276.338	36,6	1,56×10 ⁻³	88,0

ENSAMBLAJE Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

A partir del ensamblaje general obtenido con StringTie merge se identificaron 13.406 transcritos, de los cuales 1.401 presentaron una expresión diferencial significativa entre los estadios evaluados (*P-valor* ajustado < 0,05), con 507 genes sobre expresados (\log_2 fold-change $\geq 0,5$) y 894 reprimidos (\log_2 fold-change $\leq -0,5$) de la comparación entre Juveniles-Adultos (Fig. 2). 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. Únicamente 563 transcritos fueron asignados a genes, de los cuales 464 corresponden a genes únicos. Algunos genes como *CA3*, *HAI1* o *MAPT* presentaron isoformas que se están expresando diferencialmente (Tabla 3).

En el mapa de calor (Fig. 3) se evidencia el contraste que existe en el nivel de expresión de los DEGs 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 observan similitudes entre ellas a través de la escala de color y como ambas a su vez se diferencian de las réplicas del estadio 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.

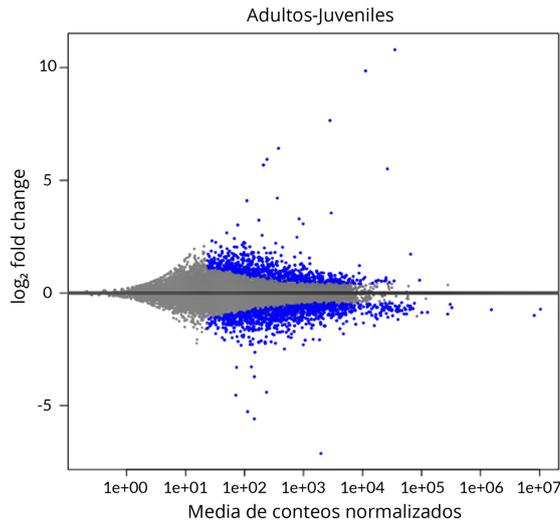


Figura 2. MA-plot a partir del análisis de expresión diferencial entre las condiciones Juvenil-Adulto, mostrando con puntos de color azul los DEGs. Arriba de la línea demarcada en el 0 del eje Y, aquellos genes sobre expresados y debajo de la línea los genes reprimidos / MA-plot from differential expression analysis between Juvenile-Adult conditions, showing with blue dots the DEGs. Above the line demarcated at 0 on the Y-axis, those genes up-regulated and below the line those genes down-regulated

Tabla 3. Ontología génica de los DEGs discutidos y datos cuantitativos del análisis de expresión diferencial Juveniles vs. Adultos. Genes expresados al alza [$\log_2(\text{FC}) \geq 0,5$] y genes expresados a la baja [$\log_2(\text{FC}) \leq -0,5, P\text{-aj} < 0,05$] / Gene ontology of the DEGs discussed and quantitative data from Juvenile vs. Adult differential expression analysis. Up-regulated genes [$\log_2(\text{FC}) \geq 0.5$] and down-regulated genes [$\log_2(\text{FC}) \leq -0.5, P\text{-adj} < 0.05$]

Función	Gen	$\log_2(\text{FC})$	$P\text{-valor}$ ajustado	Código en NCBI*
Respuesta al estrés oxidativo	CA3 v.3	9,8574	$2,82 \times 10^{-243}$	XM_048841119.1
	CA3 v.5	5,5081	$1,39 \times 10^{-30}$	XM_048841121.1
	CA3 v.6	10,7961	$1,27 \times 10^{-138}$	XM_048841122.1
	CA3 v.4	7,6559	$7,90 \times 10^{-145}$	XM_048841120.1
	CA3 v.7	5,9303	$1,47 \times 10^{-45}$	XM_048841123.1
	CA3 v.8	5,6807	$3,88 \times 10^{-40}$	XM_048841124.1
	GSR	1,7640	0,00094	XM_048848030.1
	GSTO1	0,5041	0,04529	XM_048856278.1
Respuesta inmune	PRDX1	0,7354	0,00099	XM_048861427.1
	HAI1 v.1	1,7319	$9,96 \times 10^{-5}$	XM_048834979.1
	HAF1 v.5	3,5521	$9,32 \times 10^{-61}$	XM_048817648.1
	FAU	4,0984	$3,95 \times 10^{-20}$	XM_048859325.1
	CR1	1,9875	$6,10 \times 10^{-7}$	XM_048827036.1
Metabolismo de carbohidratos	H2AJ	1,8033	$2,25 \times 10^{-5}$	XM_048835386.1
	CCL17	1,4429	0,00048	XM_048816614.1
	IDH2	-1,4260	$1,83 \times 10^{-6}$	XM_048865892.1
	ANGPTL4	-2,9651	0,00033	XM_048831150.1
Respuesta a la hipoxia	HY1	-1,6559	$4,50 \times 10^{-5}$	XM_048862036.1
	GPR27	-1,1798	0,00021	XM_048858780.1
	IGF1R	1,1661	$7,79 \times 10^{-5}$	XM_048865751.1
	ARNTL2	1,5662	0,00315	XM_048825875.1
	MAPT v. 2	2,2483	$4,90 \times 10^{-5}$	XM_048830100.1
	MAPT v. 7	1,8470	0,00061	XM_048830106.1
	MAPT v. 9	2,0471	0,00017	XM_048830108.1
Respuesta a xenobióticos	MAPT v. 16	1,3892	0,01459	XM_048830116.1
	MAPT v. 20	1,2433	0,03856	XM_048830119.1
	LY6E	1,0707	0,00028	XM_048841805.1
	NKX3-1	1,7732	0,04726	XM_048829116.1
	CD69	-1,2113	0,00312	XM_048834955.1
Respuesta a xenobióticos	CMBL	-2,2555	0,02693	XM_048839571.1
	ETHE1	-2,2316	0,03033	XM_048827828.1

*National Center for Biotechnology Information <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>

ANOTACIÓN FUNCIONAL

A partir de los 563 genes expresados diferencialmente anotados a funciones, se identificaron 583 rutas de referencia de la ontología KEGG (KO) y 8.252 términos GO, de los cuales 5.389 corresponden a funciones moleculares (65,3%), 1.560 a componentes celulares (19,0%) y 1.303 a procesos biológicos (15,7%) (Fig. 4). Estos datos se redujeron a categorías más amplias con la finalidad de facilitar la interpretación (Fig. 5), 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).

DISCUSIÓN

En este estudio se realizó la primera identificación de genes expresados diferencialmente entre juveniles y adultos de *C. caretta*, mediante un análisis de expresión diferencial realizado a partir de secuencias provenientes de RNA-Seq de un estudio previo, realizado a partir de muestras de sangre periférica de tortugas sanas sin lesiones o tumores visibles, que se encontraban bajo cuidado profesional permanente en piscinas naturales de agua de mar mantenidas a temperatura ambiente (30 °C en promedio) en la Isla San Martín de Pajares, Cartagena, Colombia (Hernández-Fernández *et al.* 2021). Las secuencias presentaron una alta calidad de acuerdo con los estándares establecidos para secuencias de lecturas cortas provenientes de Illumina (Robin *et al.* 2016), con una alta proporción de lecturas alineadas y mapeadas correctamente (Tabla 2), indicando que los pares de lecturas directas e inversas se encuentran en una orientación adecuada y tienen el tamaño correcto de inserción en la alineación con respecto al transcriptoma de referencia, revelando que las lecturas mapeadas están a una distancia coherente con lo esperado para el fragmento secuenciado (Thanksawamy-Kosalai *et al.* 2017).

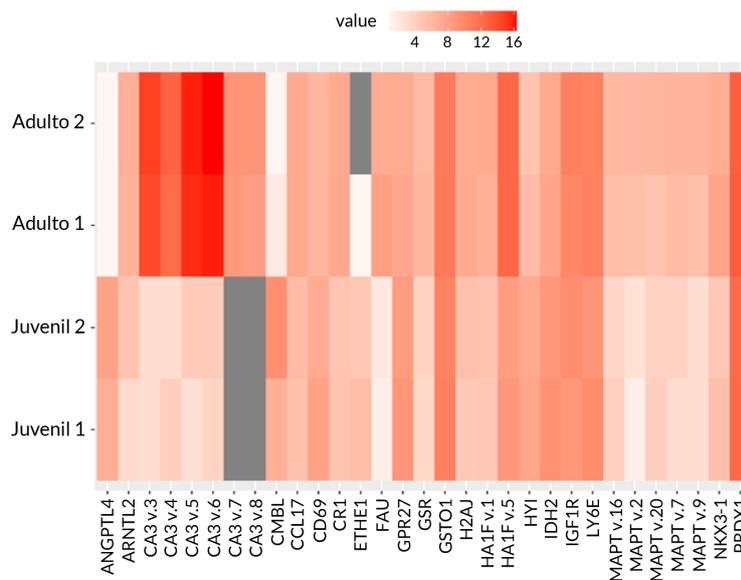


Figura 3. Mapa de calor que compara el nivel de expresión de los DEGs discutidos. Los conteos normalizados se grafican con una transformación con \log_2 para su visualización. Los genes están identificados en el eje X con el nombre del gen. La escala de colores que denominada "value" ilustra el nivel de expresión (conteos normalizados) / Heatmap comparing the level of expression of the DEGs discussed. Normalized counts are plotted with a \log_2 transformation for visualization. Genes are identified on the X-axis with the gene name. The color scale labeled "value" illustrates the level of expression of expression (normalized counts)

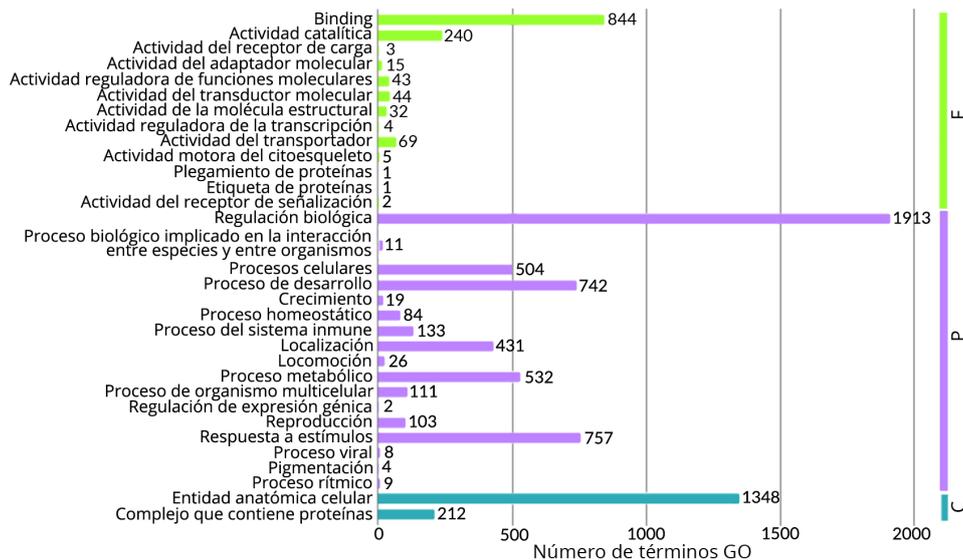


Figura 4. Distribución de la clasificación de los 8.252 términos GO obtenidos de la anotación funcional realizada a partir de los DEGs de la comparación Juveniles vs. Adultos de tortuga la caguama (*Caretta caretta*). Los términos se clasificaron en las tres categorías de GO: (P) Proceso biológico, (C) Componente celular, (F) Función molecular / Classification distribution of the 8,252 GO terms obtained from the functional annotation of the DEGs of the Juvenile vs. Adult loggerhead turtle (*Caretta caretta*) comparison. Terms were classified into the three GO categories: (P) Biological process, (C) Cellular component, (F) Molecular Function

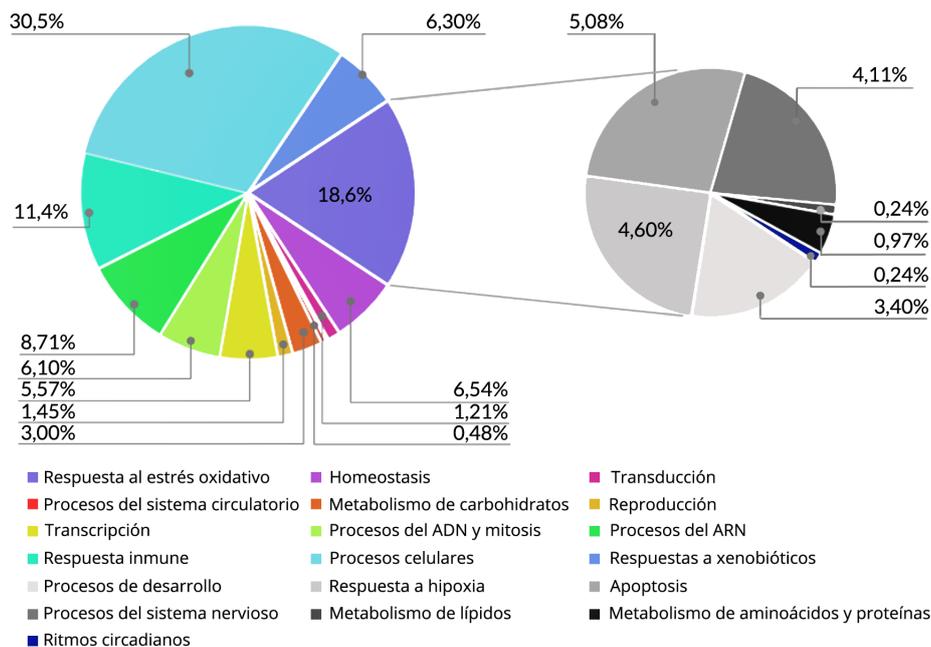


Figura 5. Categorías funcionales de los 563 DEGs anotados funcionalmente. Las categorías en la parte inferior corresponden a las funciones que se determinaron según los términos GO y las rutas de referencia de la ontología KEGG / Functional categories of the 563 functionally annotated DEGs. The categories at the bottom correspond to the functions that were determined according to the GO terms and the reference paths of the KEGG ontology

El nivel de expresión significativamente mayor de las siete variantes isoenzimáticas de la anhidrasa carbónica 3 (CA3) en tortugas adultas (Tabla 3), puede estar respondiendo a mecanismos relacionados con la protección al estrés oxidativo (Chegwidzen & Carter 2000), dada la presencia de grupos tiol libres y su capacidad para sufrir glutationilación, desempeñando un papel en la respuesta al envejecimiento, protegiendo a las tortugas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kim & Levine 2005). En investigaciones previas la expresión de CA3 en células del núcleo pulposo de ratas pardas wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), han sugerido el mantenimiento de los niveles de la proteína CA3 S-glutationilada, como estrategia potencial para combatir los efectos del estrés oxidativo involucrado en procesos de envejecimiento (Silagi *et al.* 2018). En estudios realizados en diferentes mamíferos, aves y reptiles, se determinó que las especies más longevas suelen presentar mitocondrias más eficientes y una mayor capacidad antioxidante, mostrando que 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 *C. caretta* también puede estar asociada con la respuesta a hipoxia (Wykoff *et al.* 2000). Investigaciones previas han relacionado la expresión de CA3 con mecanismos moleculares de tolerancia a la hipoxia, 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 importante en el intercambio de iones y la regulación del pH intra y extracelular (Wykoff *et al.* 2000, Potter & Harris 2004, Supuran 2016). En las especies de tortugas marinas, este mecanismo adaptativo está relacionado con el buceo, puesto que *C. caretta* permanece sumergida de siete a ocho horas diarias aproximadamente, en las cuales el organismo soporta cambios sustanciales en los niveles de pH y gases en sangre (Lutz & Bentley 1985, Hawkes *et al.* 2007, Hochscheid *et al.* 2007a). 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 el núcleo pulposo de humanos (*Homo sapiens* Linnaeus, 1758), regulando la expresión de CA3 de manera individual o conjunta en respuesta a esta condición (Silagi *et al.* 2018).

La sobre expresión de genes como *GSTO1* [\log_2 (FC) = 1,76 ($P = 0,0452$) (Adulto-Juvenil)] en los adultos, así como en el caso de CA3, puede estar involucrado con la respuesta a hipoxia y con la longevidad de *C. caretta*. En estudios realizados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900), se ha comprobado que la regulación positiva de este gen confiere longevidad bajo hipoxia, en donde las glutatión S-transferasas (GST) como *GSTO1* participan en eliminación de ROS, prolongando la vida del nemátodo después de una exposición transitoria a hipoxia, en donde la respuesta iniciada por ROS mitocondriales induce la red transcripcional *ELT-2* y *TOR*, regulando directamente la expresión de *GSTO1*, provocando una mayor esperanza de vida (Schieber & Chandel 2014). Si bien *C. elegans* es un modelo molecular ampliamente utilizado y sus hallazgos pueden proporcionar información valiosa, es importante considerar que los niveles de expresión y la regulación de *GSTO1* puede variar entre taxa por diferencias en el entorno fisiológico y en la regulación genética específica de cada organismo.

De igual forma, Kobayashi *et al.* (2006) demostraron que *GSTO1* regula la actividad de factores implicados en la respuesta a la hipoxia como el factor nuclear eritroide 2-relacionado con el factor 2 (*NRF2*), el cual tiene un papel clave en la regulación de la actividad antioxidante a nivel celular. El factor *NRF2* también se ha identificado en la actividad de las isoenzimas *PRDX* durante la hibernación de algunos animales terrestres como mecanismo de defensa antioxidante, en donde *PRDX1* [\log_2 (FC) = 0,73 ($P = 0,0009$) (Adulto-Juvenil)] es uno de los objetivos principales para la acción de *NRF2* (Storey & Storey 2010), en donde *NRF2* induce la activación de *PRDX1* en condiciones de estrés oxidativo como la hipoxia, protegiendo a las células y manteniendo la homeóstasis celular (Sabzevary-Ghahfarokhi *et al.* 2018, Franco *et al.* 2019). De manera similar se ha reportado que la expresión de la glutatión-S-reductasa o *GSR* [\log_2 (FC) = 1,76 ($P = 0,0009$) (Adulto-Juvenil)] está regulada por *NRF2* en vías asociadas a la tolerancia a la hipoxia (Singh *et al.* 2010, Hur & Gray 2011), vía en la cual *GSR* se implica en la detoxificación de ROS generadas por condiciones de hipoxia a través de la estabilización de los niveles de glutatión celular (GHS), el cual reacciona con las moléculas oxidantes estimuladas por condiciones hipóxicas antes de que interactúen con constituyentes celulares más críticos como los ácidos nucleicos y las proteínas (Ross 1988, Lluís *et al.* 2005). Asimismo, un estudio realizado por Schülke *et al.* (2012) reveló que en especies altamente tolerantes a la hipoxia como la rata topo subterránea del género *Spalax* *Güldenstädt*, 1770 hay un mayor nivel de expresión de genes como *GST* y *GSR* en condiciones normóxicas comparado con géneros sin esta capacidad de tolerancia, como *Rattus*, por lo que resulta probable que la actividad de *GSR*, *GSTO1* y *PRDX1* esté implicada en mecanismos adaptativos a la hipoxia en los adultos de *C. caretta*, dado que algunos estudios reportan que en algunos reptiles como en especies de tortugas de agua dulce (pertenecientes a los géneros *Chrysemys*, *Emydoidea*,

Trachemys, *Malaclemys*, *Terrapene*, *Graptemys* y *Chelydra*), lagartos (*Lacerta* y *Podarcis*) y serpientes (*Thamnophis* y *Vipera*), la regulación de los niveles de *GST* y *PRDXs* se dan en respuesta al estrés oxidativo a bajas temperaturas y la hipoxia (Storey 2006b, Krivoruchko & Storey 2010).

En general, se observa una regulación al alza de los genes asociados con respuesta a hipoxia si se compara el estadio adulto con el juvenil. Las tortugas adultas poseen una capacidad de buceo superior a la que presentan tortugas en el estadio juvenil, teniendo en cuenta que la duración de la inmersión aumenta con el tamaño del cuerpo y la edad (van Dam & Diez 1997, Hochscheid *et al.* 2007b). Este patrón podría responder a la regulación al alza de genes como *ARNTL2* [\log_2 (FC)= 1,56 ($P = 0,0031$) (Adulto-Juvenil)], en los adultos, el cual está relacionado con proteínas reguladoras centrales importantes en el mantenimiento de los ritmos circadianos y en la inducción a hipoxia, asociada con la adaptación a bajos niveles de oxígeno (Gu *et al.* 2000), tal y como se determinó en la anotación funcional. De igual forma, la sobre expresión en los adultos de *C. caretta* de cinco variantes de transcripción del gen *MAPT* (Tabla 3), puede estar asociada a esta capacidad superior de buceo, puesto que, en estudios previos realizados en peces cebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822), este gen mostró un aumento de las isoformas de transcripción en condiciones de hipoxia, activándose las quinasas que fosforilan la tau (Chen *et al.* 2003, Moussavi *et al.* 2014). En contraste, en el caso del gen *IGF1R* [\log_2 (FC)= 1,16 ($P = 7,79 \times 10^{-5}$) (Adulto-Juvenil)], estudios en peces cebra, han mostrado que el factor inducible por hipoxia (HIF) promueve la transcripción de *IGFBP1*, restringiendo la activación de *IGF1R* (Kamei 2020), mientras que en los humanos se ha reportado un papel 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 *IGF1R* funciona en algunos reptiles, incluyendo a las tortugas marinas. El gen *IGF1R* 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 determinaron que en murciélagos de brandt, (*Myotis brandtii* Eversmann, 1845), los cambios específicos en *IGF1R* derivan en la extensión de su esperanza de vida (Seim *et al.* 2013), lo cual coincide con algunas de las funciones con las que *IGF1R* 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 & Bronikowsk (2016), que explicaron que la expresión de *IGF1R* está relacionada con la supervivencia celular y la longevidad, a través de la activación de *FOXO*, con evidencias iniciales en *C. 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 sobre expresión del gen en estadios adultos de *C. caretta* en este estudio. La vía *PI3K-Akt* también se asocia a mecanismos de tolerancia a la hipoxia dado que se ha identificado su activación a partir de genes como *LY6E* [\log_2 (FC)= 1,07 ($P = 0,0003$) (Adulto-Juvenil)]. Este gen es un activador de HIF-1 α aumentando su expresión, conduciendo a la disminución de los niveles de expresión de ARNm de *PTEN*, aumentando la expresión de factores proangiogénicos como *VEGFA* y *PDGFB* y activando la vía *PI3K-Akt* (Yeom *et al.* 2016), en donde la inducción de factores angiogénicos y de crecimiento, conducen a la formación y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que se presenta como respuesta a condiciones hipóxicas (Chen *et al.* 2009).

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 ($P = 4,5 \times 10^{-5}$) (Adulto-Juvenil)], *IDH2* [\log_2 (FC)= -1,42 ($P = 1,8 \times 10^{-6}$) (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, estos genes 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 las rutas alternativas del catabolismo anaeróbico de carbohidratos presentan ventajas en comparación con procesos como la glucólisis, debido a que resultan en un mayor rendimiento de ATP y en la generación de productos finales fácilmente excretables durante los periodos de hipoxia, estableciendo y manteniendo un estado hipometabólico (Milton 1994, Storey 2007, Krivoruchko & Storey 2015). Asimismo, en estudios realizados en 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 vertebrados acuáticos como el bagre darkbarbel (*Pelteobagrus vachelli* Richardson, 1846), debido a la mayor demanda energética de algunos órganos como el hígado en respuesta a esta condición, en donde el metabolismo de los carbohidratos es necesario para restablecer la homeostasis, 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 tricarboxílico; en vertebrados marinos como la corvina amarilla (*Larimichthys crocea* Richardson, 1846) se ha descrito 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 *C. caretta* 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 ocurre 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 como los mamíferos, 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 & Madsen 2011). Lo anterior, concuerda con el tipo de respuesta inmune que la anotación funcional determinó para al menos tres de los genes sobre expresados en los adultos dentro de esta categoría, en donde los genes *FAU*, *H2AJ* y *HA1F*, 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 ($P = 3,95 \times 10^{-20}$) (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 ($P = 2,25 \times 10^{-5}$) (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 *HA1F* (antígeno de histocompatibilidad clase I de tipo cadena alfa F10) [*HA1F* v. 1 \log_2 (FC)= 1,73 ($P = 9,96 \times 10^{-5}$)] [*HA1F* v. 5 \log_2 (FC)= 3,55 ($P = 9,32 \times 10^{-61}$) (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, se ha reportado que los MHC de la clase I en algunos vertebrados como el salmón del Atlántico (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) presentan una actividad asociada a la resistencia a patógenos bacterianos y virales (Lukacs *et al.* 2007). Por otra parte, a pesar de que genes como *CCL17* [\log_2 (FC)= 1,44 ($P = 0,0005$) (Adulto-Juvenil)] no presentaron términos GO relacionados con la

respuesta inmune humoral en la anotación funcional del presente estudio, investigaciones previas en ratones (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) han vinculado la actividad de este gen con la respuesta inmune humoral, en donde la deficiencia de *CCL17* produce una respuesta humoral reducida (Stutte *et al.* 2010) siendo un gen de gran importancia en este tipo de respuesta inmune. De la misma manera el gen *CR1* [\log_2 (FC)= 1,99 ($P = 6,10 \times 10^{-7}$) (Adulto-Juvenil)], también expresado al alza en las tortugas adultas, se encuentra asociado a funciones respectivas a la respuesta inmune humoral. En estudios realizados en *M. musculus*, se ha observado que este tipo de respuesta se ve mejorada por la acción de la expresión del gen *CR1* 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 *C. caretta*, 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 especies de tortugas terrestres como la tortuga gigante de Pinta (*Chelonoidis abingdonii* Günther, 1877), en las que la respuesta inmune es 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 dos etapas de vida de *C. caretta* estudiadas, se encontraron genes con funciones asociadas a la respuesta a xenobióticos. Los juveniles estudiados mostraron una mayor expresión de genes anotados con este tipo de funciones en comparación con los adultos, probablemente asociado a una disminución de la capacidad para desintoxicar y transportar sustancias químicas fuera del cuerpo a medida que el organismo envejece, como se ha demostrado en estudios realizados en hígados de *R. norvegicus*, que demostraron la existencia de diferencias en el metabolismo de los xenobióticos entre las etapas de vida (Lee *et al.* 2008). Dentro de esta categoría el gen *CD69* [\log_2 FC= -1,21 ($P = 0,0031$) (Adulto-Juvenil)] que se conoce ejerce un rol en procesos proinflamatorios, la mediación de las células inmunitarias, la exportación de los timocitos maduros y como marcador de activación de las células T (Marzio *et al.* 1999, Sancho *et al.* 2005), presentó una expresión significativamente menor en los adultos, lo cual podría explicarse con la evidencia disponible en investigaciones en otros vertebrados como *H. sapiens* y *M. musculus*, 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 & Meydani 2008).

Asimismo, el gen *CMBL* [\log_2 FC= -2,25 ($P = 0,0269$) (Adulto-Juvenil)], asociado a la codificación del homólogo de la carboximetilbutenolida, conocido como un catalizador de reacciones químicas del tolueno y clorobenceno, y por estar involucrado con la respuesta al daño y reparación del ADN (Schmidt & Knackmuss 1980, Niu *et al.* 2012) presentó una sobreexpresión en los juveniles de *C. caretta*. Esta sobreexpresión, podría indicar una respuesta general a compuestos químicos probablemente presentes en su ambiente o dieta, dado que estudios previos han detectado compuestos como el hexaclorobenceno en órganos de tortugas verdes (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758) y tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea* Eschscholtz, 1829) (Gardner *et al.* 2003), lo que sugiere que podrían estar expuestos a este tipo de contaminantes, en donde la expresión de *CMBL* podría estar representando una posible vía de desintoxicación a este tipo de compuestos en *C. caretta* en su etapa juvenil. De manera similar la sobreexpresión del gen *ETHE1* [\log_2 FC= -2,23 ($P = 0,0303$) (Adulto-Juvenil)] en los juveniles, podría relacionarse a procesos de detoxificación de contaminantes, debido a que tiene una función importante en la degradación del sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Grings *et al.* 2020) a través de su oxidación utilizando sulfuro quinona oxidorreductasa (SQR) según lo mostrado por la anotación funcional del presente estudio. La ruta metabólica a 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 H_2S 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 *M. musculus* (Li *et al.* 2006). Esta expresión significativamente mayor de algunos genes asociados a la respuesta a xenobióticos en los juveniles en comparación con los adultos puede deberse a que la expresión de muchas enzimas de biotransformación se ven influenciadas por la edad del organismo, dado que, en algunos invertebrados como artemias (*Artemia salina* Linnaeus, 1758), mamíferos como cobayas (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758), ratones (*M. musculus*), ratas (*R. norvegicus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) y aves como gallos (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758) se observan diferencias dependientes de la edad o de la etapa de crecimiento en relación con la expresión de genes con este tipo de funciones (Gregus *et al.* 1985, Coulet *et al.* 1996, Papadopoulos *et al.* 2004). Además, se ha reportado que en tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata* Linnaeus, 1766) hay una mayor expresión de genes asociados a enzimas biotransformadoras en etapas más tempranas del ciclo de vida en comparación con lo evidenciado en ejemplares adultos (Richardson *et al.* 2009).

La capacidad de buceo superior de los adultos de *C. caretta* 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, los mecanismos mediante los que se genera la tolerancia a los bajos niveles de oxígeno durante las inmersiones parecen variar entre estadios, en donde la tolerancia a la anoxia en los juveniles estaría principalmente mediada por la expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos.

Se propone una relación importante entre la expresión de los genes *CA3* y *IGF1R* con la longevidad de la especie por su sobreexpresión 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.

La respuesta inmunológica humoral mostró un aumento en su actividad en relación con la edad de *C. caretta*, presentando niveles de expresión mayores en tortugas adultas. Por el contrario, la respuesta a xenobióticos parece ser menor en las etapas adultas de *C. caretta*, probablemente relacionado con procesos de inmunosenescencia, generando una disminución en la capacidad de desintoxicación de sustancias.

Este estudio proporciona una primera aproximación detallada de cómo la etapa de vida de *Caretta caretta* tiene una influencia en la expresión génica, especialmente en relación con la tolerancia a la hipoxia y la respuesta inmune. La identificación de genes clave y rutas metabólicas involucradas en estas respuestas no solo amplía el conocimiento sobre la biología y ecología de esta especie en peligro, con posibles aplicaciones prácticas en su conservación. Estos hallazgos sirven como base de futuras investigaciones que exploren intervenciones ambientales o a nivel génico para mitigar los efectos de las amenazas que enfrenta *C. caretta* en la actualidad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Oficina de Investigación, Creación e Innovación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Agradecemos al Oceanario CEINER en la isla de San Martín Pajares y al Acuario y Museo Marítimo en Santa Marta Rodadero por su colaboración en la obtención y suministro de muestras de tortugas *C. caretta*, para el desarrollo de este estudio. Las muestras se obtuvieron bajo un permiso de investigación otorgado por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Territorial (#24 del 22 de junio de 2012) y Contrato de Acceso a Recursos Genéticos (#64 del 23 de abril de 2013).

LITERATURA CITADA

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 & D Blankenberg. 2018. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic Acids Research* 48(W1): 8205-8207. <<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa434>>

- Agarwal A, D Koppstein, J Rozowsky, A Sboner, L Habegger, LW Hillier, R Sasidharan, V Reinke, RH Waterston & M Gerstein. 2010.** Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *BMC Genomics* 11(383): 1-16. <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-383>>
- Alberghina D, M Panzera, V Maccarrone, F Spadola, G Insacco & G Piccione. 2015.** Study of some blood parameters in *Caretta caretta* during a recovery period. *Comparative Clinical Pathology* 24: 193-195. <<https://doi.org/10.1007/s00580-014-1923-9>>
- Alvarez M, AW Schrey & CL Richards. 2015.** Ten years of transcriptomics in wild populations: what have we learned about their ecology and evolution? *Molecular Ecology* 24(4): 710-725. <<https://doi.org/10.1111/mec.13055>>
- Andrews S. 2018.** FastQC A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics. Babraham Institute, Cambridge. <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>
- Banerjee SM, JA Stoll, CD Allen, JM Lynch, HS Harris, L Kenyon, RE Connon, EJ Sterling, E Naro-Maciell, K McFadden, MM Lamont, J Bengel, NB Fernandez, JA Seminoff, SR Benson, RL Lewison, T Eguchi, TM Summers, JR Hapdei, MR Rice, S Martin, T Todd, PH Dutton, GH Balazs & LM Komoroske. 2021.** Species and population specific gene expression in blood transcriptomes of marine turtles. *BMC Genomics* 22(346): 1-16. <<https://doi.org/10.1186/s12864-021-07656-5>>
- Bentley BP, BJ Haas, JN Tedeschi & 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. <<https://doi.org/10.1111/mec.14087>>
- Block BA, ID Jonsen, SJ Jorgensen, AJ Winship, SA Shaffer, SJ Bograd, L Hazen, DG Foley, GA Breed, A Harrison, JE Ganong, A Swithenbank, M Castleton, H Dewar, BR Mate, GL Shillinger, KM Schaefer, SR Benson, MJ Weise, RW Henry & DP Costa. 2011.** Tracking apex marine predator movements in a dynamic ocean. *Nature* 475(7354): 86-90. <<https://doi.org/10.1038/nature10082>>
- Bolger AM, M Lohse & B Usadel. 2014.** Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120. <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>>
- Bolten AB, PL Lutz, JA Musick & J Wyneken. 2003.** Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages. In: Lutz PL, JA Musick & J Wyneken (eds). *The biology of sea turtles 2*: 243-257. CRC Press, Boca Raton.
- Cásale P & AD Tucker. 2017.** *Caretta caretta* (amended version of 2015 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T3897A119333622. IUCN Red List. <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T3897A119333622.en>>
- Chamorro C. 2019.** Análisis de datos de RNA-Seq empleando diferentes paquetes desarrollados dentro del proyecto Bioconductor para estudios de expresión génica diferencial, 74 pp. Universitat Oberta de Catalunya, Barcelona.
- Chegwidden WR & ND Carter. 2000.** Introduction to the carbonic anhydrases. In: Chegwidden WR, ND Carter & YH Edwards (eds). *The carbonic anhydrases: New horizons*, pp.13-28. Birkhäuser Verlag Basel, Basel.
- Chen GJ, J Xu, SA Lahousse, NL Caggiano & SM de la Monte. 2003.** Transient hypoxia causes Alzheimer-type molecular and biochemical abnormalities in cortical neurons: potential strategies for neuroprotection. *Journal Alzheimer's Disease* 5(3): 209-228. <[doi:10.3233/JAD-2003-5305](https://doi.org/10.3233/JAD-2003-5305)>
- Chen L, A Endler & F Shibasaki. 2009.** Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Experimental & Molecular Medicine* 41(12): 849-857. <<https://doi.org/10.3858/emmm.2009.41.12.103>>
- Chow JC, N Kyritsis, M Mills, MH Godfrey, CA Harms, PE Anderson & AM Shedlock. 2021.** Tissue and temperature-specific RNA-Seq analysis reveals genomic versatility and adaptive potential in wild sea turtle hatchlings (*Caretta caretta*). *Animals* 11(11): 1-14. <<https://doi.org/10.3390/ani11113013>>
- Cocci P, M Capriotti, G Mosconi & FA 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. <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.024>>
- Cocci P, G Mosconi, L Bracchetti, JM Nalocca, E Frapiccini, M Marini, G Caprioli, G Sagratini & FA 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. <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.118>>
- Cocci P, G Mosconi & FA 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. <<https://doi.org/10.3390/ani12050594>>
- Conesa A, S Götz, JM García-Gómez, J Terol, M Talón & M Robles. 2005.** Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(18): 3674-3676. <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>>
- Coulet M, C Eeckhoutte & P Galtier. 1996.** Ontogenic development of drug-metabolizing enzymes in male chicken liver. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 74(1): 32-37. <<https://doi.org/10.1139/y95-221>>
- Denley A, ER Bonython, GW Booker, LJ Cosgrove, BE Forbes, CW Ward & JC 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. <<https://doi.org/10.1210/me.2004-0183>>
- Dolmán AJ. 1990.** The potential contribution of marine resources to sustainable development in small-island developing countries. In: Beller W, P D'Ayala & P Hein (eds). *Sustainable development and environmental management of small islands. Man and the Biosphere Series*, pp. 87-102. Parthenon, New Jersey.
- Eckert KL, KA Bjørndal, FA Abreu-Grobois & M Donnelly. 2000.** Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE, Publicación 4: 1-270. <<https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/1999-076-Es.pdf>>

- Frasca D, AM Landin, RL Riley & BB Blomberg. 2008.** Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *Journal of Immunology* 180(5): 2741-2746. <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2741>>
- Freitas C, R Caldeira & T Dellinger. 2019.** Surface behavior of pelagic juvenile loggerhead sea turtles in the eastern North Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 510: 73-80. <<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.10.006>>
- Gardner SC, MD Pier, R Wesselman & JA Juarez. 2003.** Organochlorine contaminants in sea turtles from the eastern Pacific. *Marine Pollution Bulletin* 46(9): 1082-1089. <[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00254-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00254-6)>
- Gregus Z, F Varga & A Schmelas. 1985.** Age-development and inducibility of hepatic glutathione S-transferase activities in mice, rats, rabbits and guinea-pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 80(1): 85-90. <[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90135-5](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90135-5)>
- Grings M, M Wajner & 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(3): 556-575. <<https://doi.org/10.1007/s10571-020-00976-2>>
- Gu YZ, JB Hogenesch & CA Bradfield. 2000.** The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40(1): 519-561. <<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519>>
- Guillemot F, A Billault, O Pourquie, G Behar, AM Chaussé, R Zoorob, G Kreibich & 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. <<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03132.x>>
- Harman D. 1956.** Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 27(14): 298-300. <[doi: 10.1126/sageke.2002.37.cp14](https://doi.org/10.1126/sageke.2002.37.cp14)>
- Hawkes LA, AC Broderick, MS Coyne, MH Godfrey & BJ Godley. 2007.** Only some like it hot - quantifying the environmental niche of the loggerhead sea turtle. *Diversity and Distributions* 13(4): 447-457. <<https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00354.x>>
- Heikkilä M, A Pasanen, KI Kivirikko & J Myllyharju. 2011.** Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(23): 3885-3901. <<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0679-5>>
- Hernández-Fernández J, A Pinzón & L Mariño-Ramírez. 2017.** De novo transcriptome assembly of loggerhead sea turtle nesting of the Colombian Caribbean. *Genomics Data* 13: 18-20. <<https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.06.005>>
- Hernández-Fernández J, AM Pinzón-Velasco, EA López-Barrera, M Rodríguez-Becerra, JL 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. <<https://doi.org/10.7717/peerj.12395>>
- Hochscheid S, F Bentivegna, MN Bradai & GC Hays. 2007a.** Overwintering behaviour in sea turtles: dormancy is optional. *Marine Ecology-Progress Series* 340: 287-298. <[doi:10.3354/meps340287](https://doi.org/10.3354/meps340287)>
- Hochscheid S, CR McMahon, CJA Bradshaw, F Maffucci, F Bentivegna & GC Hays. 2007b.** Allometric scaling of lung volume and its consequences for marine turtle diving performance. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 148(2): 360-367. <<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.010>>
- Hochscheid S, F Bentivegna, A Hamza & GC Hays. 2010.** When surfacers do not dive: multiple significance of extended surface times in marine turtles. *Journal of Experimental Biology* 213(8): 1328-1337. <<https://doi.org/10.1242/jeb.037184>>
- Hoekstra LA, TS Schwartz, AM Sparkman, DAW Miller & AM Bronikowski. 2020.** The untapped potential of reptile biodiversity for understanding how and why animals age. *Functional Ecology* 34(1): 38-54. <<https://doi.org/10.1111/1365-2435.13450>>
- Hur W & NS Gray. 2011.** Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Current Opinion in Chemical Biology* 15(1): 162-173. <<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.009>>
- Iverson AR, I Fujisaki, MM Lamont & KM Hart. 2019.** Loggerhead Sea turtle (*Caretta caretta*) diving changes with productivity, behavioral mode, and sea surface temperature. *PLoS ONE* 14(8): 19. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220372>>
- Jackowiak P, M Figlerowicz & A Żmieńko. 2011.** Transcriptome sequencing: next generation approach to RNA functional analysis. *BioTechnologia* 92(4): 311-319. <<https://journals.pan.pl/Content/82328/mainfile.pdf>>
- Kamei H. 2020.** Oxygen and embryonic growth: the role of insulin-like growth factor signaling. *General and Comparative Endocrinology* 294: 113473. <<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113473>>
- Keller JM, JR Kucklick, MA Stamper, CA Harms & PD McClellan-Green. 2004.** Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environmental Health Perspectives* 112(10): 1074-1079. <<https://doi.org/10.1289/ehp.6923>>
- Keller JM, PD McClellan-Green, AM Lee, MD Arendt, PP Maier, AL Segars, JD Whitaker, DE Keil & MM 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 103(3-4): 269-281. <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.029>>
- Keller JM, PD McClellan-Green, JR Kucklick, DE Keil & MM Peden-Adams. 2006.** Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and *in vitro* exposure experiments. *Environmental Health Perspectives* 114(1): 70-76. <<https://doi.org/10.1289/ehp.8143>>
- Kim G & R Levine. 2005.** Molecular determinants of S-glutathionylation of carbonic anhydrase 3. *Antioxidants and Redox Signaling* 7(7-8): 849-854. <<https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.849>>

- Kim D, B Langmead & SL Salzberg. 2015.** HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12(4): 357-360. <<https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>>
- Kobayashi A, MI Kang, Y Watai, KI Tong, T Shibata, K Uchida & M Yamamoto. 2006.** Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and Cellular Biology* 26(1): 221-229. <<https://doi.org/10.1128/MCB.26.1.221-229.2006>>
- Kovaka S, AV Zimin, GM Pertea, R Razaghi, SL Salzberg & M Pertea. 2019.** Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Biology* 20(1): 1-14. <<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1910-1>>
- Krivoruchko A & KB Storey. 2010.** Activation of antioxidant defenses in response to freezing in freeze-tolerant painted turtle hatchlings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1800(7): 662-668. <<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.015>>
- Krivoruchko A & KB Storey. 2015.** Turtle anoxia tolerance: biochemistry and gene regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1850(6): 1188-1196. <<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.02.001>>
- Ku HH, UT Brunk & RS Sohal. 1993.** Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen-peroxide production and longevity of mammalian-species. *Free Radical Biology and Medicine* 15(6): 621-627. <[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90165-Q](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90165-Q)>
- Lambert AJ, HM Boysen, JA Buckingham, T Yang, A Podlutzky, SN Austad & MD Marca. 2007.** Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell* 6(5): 607-618. <<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00312.x>>
- Lapennas GN & PL Lutz. 1982.** Oxygen affinity of sea turtle blood. *Respiration Physiology* 48(1): 59-74. <[https://doi.org/10.1016/0034-5687\(82\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0034-5687(82)90050-0)>
- Lee JS, WO Ward, DC Wolf, JW Allen, C Mills, MJ DeVito & JC Corton. 2008.** Coordinated changes in xenobiotic metabolizing enzyme gene expression in aging male rats. *Toxicological Sciences* 106(1): 263-283. <<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn144>>
- Li GX, Y Hirabayashi, BI Yoon, Y Kawasaki, I Tsuboi, Y Kodama, Y Kurokawa, J Yodoi, J Kanno & T Inoue. 2006.** Thioredoxin overexpression in mice, model of attenuation of oxidative stress, prevents benzene-induced hematolymphoid toxicity and thymic lymphoma. *Experimental Hematology* 34(12): 1687-1697. <<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.08.005>>
- Li C, L Song, J Zhao, L Zhu, H Zou, H Zhang, H Wang & 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. <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.08.013>>
- Li H, B Handsaker, A Wysoker, T Fennell, J Ruan, N Homer, G Marth, G Abecasis & R Durbin. 2009.** The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16): 2078-2079. <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>>
- Liao Y, GK Smyth & W Shi. 2014.** featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30(7): 923-930. <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>>
- Lin K, JB Dorman, A Rodan & 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. <doi: 10.1126/science.278.5341.1319>
- Lluis JM, A Morales, C Blasco, A Colell, M Mari, C García-Ruiz & JC Fernández-Checa. 2005.** Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocytes during hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 280(5): 3224-3232. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M408244200>>
- Love MI, W Huber & S Anderson. 2014.** Moderated estimation of fold changes and dispersion of RNA-Seq data with DESeq. *Genome Biology* 15(12): 550. <<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>>
- Lukacs MF, H Harstad, U Grimholt, M Beetz-Sargent, GA Cooper, L Reid, HG Bakke, RB Phillips, KM Miller, WS Davidson & BF Koop. 2007.** Genomic organization of duplicated major histocompatibility complex class I regions in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 8(1): 1-16. <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-251>>
- Lutcavage ME, PG Bushnell & DR Jones. 1990.** Oxygen transport in the leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea*. *Physiological Zoology* 63(5): 1012-1024. <<https://doi.org/10.1086/physzool.63.5.30152626>>
- Lutz PL & TB Bentley. 1985.** Respiratory physiology of diving in the Sea Turtle. *Copeia* 1985(3): 671-679. <<https://doi.org/10.2307/1444761>>
- Marco A, C Carreras & E Abella. 2008.** Tortuga boba - *Caretta caretta*. En: Carrascal LM & A Salvador (eds). Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles, 24 pp. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Marzio R, J Mauël & S Betz-Corradin. 1999.** CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 21(3): 565-582. <<https://doi.org/10.3109/08923979909007126>>
- Mayne B, AD Tucker, O Berry & S Jarman. 2020.** Lifespan estimation in marine turtles using genomic promoter CpG density. *PLoS ONE* 15(7): 1-8. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236888>>
- McDermaid A, B Monier, J Zhao, B Liu & Q Ma. 2019.** Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Briefings in Bioinformatics* 20(6): 2044-2054. <<https://doi.org/10.1093/bib/bby067>>
- Metzker ML. 2010.** Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11(1): 31-46. <<https://doi.org/10.1038/nrg2626>>
- Milton SL. 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*, 175 pp. University of Miami, Miami.
- Moussavi SH, M Newman, S Ganesan, M Chen, R Martins, G Verdile & M Lardelli. 2014.** Hypoxia alters expression of Zebrafish Microtubule-associated protein Tau (*mapta*, *maptb*) gene transcripts. *BMC Research Notes* 7(767): 1-9. <<https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-767>>

- Mu Y, W Li, Z Wei, L He, W Zhang & 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. <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.028>>
- Nath AK, J Ma, ZZ Chen, Z Li, MDC Vitery, ML Kelley, RT Peterson, RE Gerszten & JJ Yeh. 2020.** Genetic deletion of *gpr27* alters acylcarnitine metabolism, insulin sensitivity, and glucose homeostasis in zebrafish. *The FASEB Journal* 34(1): 1546-1557. <10.1096/fj.201901466R>
- Niu N, DJ Schaid, RP Abo, K Kalari, BL Fridley, Q Feng, G Jenkins, A Batzler, AG Brisbin, JM Cunningham, L Li, Z Sun, P Yang & 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. <<https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-422>>
- Ogg S, S Paradis, S Gottlieb, GI Patterson, L Lee, HA Tissenbaum & G Ruvkun. 1997.** The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389(6654): 994-999. <<https://doi.org/10.1038/40194>>
- Olson KR, JA Donald, RA Dombkowski & SF Perry. 2012.** Evolutionary and comparative aspects of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 184(2): 117-129. <<https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.04.004>>
- Ozsolak F & PM Milos. 2011.** RNA sequencing: advances, challenges, and opportunities. *Nature Reviews Genetics* 12(2): 87-98. <<https://doi.org/10.1038/nrg2934>>
- Page-Karjian A, ME Serrano, J Cartzendafner, A Morgan, BW Ritchie, CR Gregory, J Braun-McNeill, JR Perrault, EF Christiansen & CA Harms. 2020.** Molecular assessment of chelonid alphaherpesvirus 5 infection in tumor-free green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles in North Carolina, USA, 2015-2019. *Animals* 10(11): 1964. <<https://doi.org/10.3390/ani10111964>>
- Papadopoulos AI, E Lazaridou, G Mauridou & M Touraki. 2004.** Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. *Marine Biology* 144: 295-301. <<https://doi.org/10.1007/s00227-003-1203-8>>
- Pappworth IY, C Hayes, J Dimmick, BP Morgan, VM Holers & KJ 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. <<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.06.001>>
- Potter C & AL Harris. 2004.** Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumor: hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle* 3(2): 159-162. <<https://doi.org/10.4161/cc.3.2.618>>
- Prentice HM, SL Milton, D Scheurle & PL Lutz. 2004.** The upregulation of cognate and inducible heat shock proteins in the anoxic turtle brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 24(7): 826-828. <doi:10.1097/01.wcb.0000126565.27130.79>
- Quesada V, S Freitas-Rodríguez, J Miller, JG Pérez-Silva, ZF Jiang, W Tapia & C López-Otín. 2019.** Giant tortoise genomes provide insights into longevity and age-related disease. *Nature Ecology & Evolution* 3(1): 87-95. <<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0733-x>>
- Ramaglia V & LT Buck. 2004.** Time-dependent expression of heat shock proteins 70 and 90 in tissues of the anoxic western painted turtle. *Journal of Experimental Biology* 207: 3775-3784. <<https://doi.org/10.1242/jeb.01211>>
- Raymond W, NA Vo & A Kiyoshi. 2012.** Transformations for the compression of FASTQ quality scores of next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28(5): 628-635. <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr689>>
- Richardson KL, G Gold-Bouchot & D Schlenk. 2009.** The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles: loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150(2): 279-284. <<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.005>>
- Robin JD, AT Ludlow, R LaRanger, WE Wright & JW Shay. 2016.** Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing. *Scientific Reports* 6(1): 1-10. <<https://doi.org/10.1038/srep24067>>
- Ross D. 1988.** Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacology & Therapeutics* 37(2): 231-249. <[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(88\)90027-7](https://doi.org/10.1016/0163-7258(88)90027-7)>
- Rossi S, NG de Queiroz-Hazarbassanov, AM Sánchez-Sarmiento, FES Prioste & ER Matushima. 2016.** Immune response of green sea turtles with and without fibropapillomatosis: Evaluating oxidative burst and phagocytosis via flow cytometry. *Chelonian Conservation and Biology* 15(2): 273-278. <<https://doi.org/10.2744/CCB-1202.1>>
- Rousselet E, M Levin, E Gebhard, BM Higgins, S DeGuise & CA Godard-Coddig. 2013.** Evaluation of immune functions in captive immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 156(1-2): 43-53. <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.004>>
- Sabzevary-Ghahfarokhi M, M Shohan, H Shirzad, G Rahimian, A Soltani, M Ghatreh-Samani, F Deris, N Bagheri, M Shafigh & K Tahmasbi. 2018.** The regulatory role of Nrf2 in antioxidants phase2 enzymes and IL-17A expression in patients with ulcerative colitis. *Pathology-Research and Practice* 214(8): 1149-1155. <<https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.06.001>>
- Sancho D, M Gómez & F Sánchez-Madrid. 2005.** CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in Immunology* 26(3): 136-140. <<https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.006>>
- Schieber M & NS Chandel. 2014.** TOR signaling couples oxygen sensing to lifespan in *C. elegans*. *Cell Reports* 9(1): 9-15. <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.075>>

- Schmidt E & 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. <<https://doi.org/10.1042/bj1920339>>
- Schülke S, D Dreidax, A Malik, T Burmester, E Nevo, M Band, A Avivi & T Hankeln. 2012.** Living with stress: regulation of antioxidant defense genes in the subterranean, hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax*. *Gene* 500(2): 199-206. <<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.019>>
- Schwartz TS & AM 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. <<https://doi.org/10.1093/icb/icw046>>
- Seim I, X Fang, Z Xiong, AV Lobanov, Z Huang, S Ma & VN Gladyshev. 2013.** Genome analysis reveals insights into physiology and longevity of the Brandt's bat *Myotis brandtii*. *Nature Communications* 4(1): 1-8. <<https://doi.org/10.1038/ncomms3212>>
- Shiina T, H Inoko & JK Kulski. 2004.** An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens* 64(6): 631-649. <<https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00327.x>>
- Silagi ES, P Batista, IM Shapiro & MV 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. <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23196-7>>
- Singh S, S Vrishni, BK Singh, I Rahman & P Kakkar. 2010.** Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radical Research* 44(11): 1267-1288. <<https://doi.org/10.3109/10715762.2010.507670>>
- Sparkman AM, TS Schwartz, JA Madden, SE Boyken, NB Ford, JM Serb & AM 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. <<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.022>>
- Speakman JR, JD Blount, AM Bronikowski, R Buffenstein, C Isaksson, TBL Kirkwood & C Selman. 2015.** Oxidative stress and life histories: Unresolved issues and current needs. *Ecology and Evolution* 5(24): S745-S757. <<https://doi.org/10.1002/ece3.1790>>
- Steinmann GG. 1986.** Changes in the human thymus during aging. *Current Topics in Pathology* 75: 43-88. <doi: 10.1007/978-3-642-82480-7_2>
- Storey KB. 2004.** Molecular mechanisms of anoxia tolerance. *International Congress Series* 1275: 47-54. <<https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.08.072>>
- Storey KB. 2006a.** Gene hunting in hypoxia and exercise. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 558: 289-305. <doi: 10.1007/978-0-387-34817-9_24>
- Storey KB. 2006b.** Reptile freeze tolerance: metabolism and gene expression. *Cryobiology* 52(1): 1-16. <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.09.005>>
- Storey KB. 2007.** Anoxia tolerance in turtles: Metabolic regulation and gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147(2): 263-276. <<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.019>>
- Storey KB & JM Storey. 2010.** Metabolic rate depression: the biochemistry of mammalian hibernation, 78 pp. *Advances in Clinical Chemistry, Ontario*.
- Stutte S, T Quast, N Gerbitzki, T Savinko, N Novak, J Reifenberger, B Homey, W Kolanus, H Alenius & 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. <<https://doi.org/10.1073/pnas.0906126107>>
- Supuran CT. 2016.** Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemical Journal* 473(14): 2023-2032. <<https://doi.org/10.1042/BCJ20160115>>
- Swimmer JY. 2006.** Relationship between basking and fibropapillomatosis in captive green turtles (*Chelonia mydas*). *Chelonian Conservation and Biology* 5(2): 305-309. <[https://doi.org/10.2744/1071-8443\(2006\)5\[305:RBBAFI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2744/1071-8443(2006)5[305:RBBAFI]2.0.CO;2)>
- Tedeschi JN, WJ Kennington, O Berry, S Whiting, M Meekan & NJ Mitchell. 2015.** Increased expression of *Hsp70* and *Hsp90* mRNA as biomarkers of thermal stress in loggerhead turtle embryos (*Caretta caretta*). *Journal of Thermal Biology* 47: 42-50. <<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.11.006>>
- Teelucksingh S, S Eckert & 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. <<https://doi.org/10.4000/etudescaribeennes.10990>>
- Tenney SM, D Bartlett, JP Farber & JE Remmers. 1974.** Mechanics of the respiratory cycle in the green turtle (*Chelonia mydas*). *Respiration Physiology* 22(3): 361-368. <[https://doi.org/10.1016/0034-5687\(74\)90084-X](https://doi.org/10.1016/0034-5687(74)90084-X)>
- Thankaswamy-Kosalai S, P Sen & 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. <<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.03.001>>
- Ujvari B & T Madsen. 2011.** Do natural antibodies compensate for humoral immunosenescence in tropical pythons? *Functional Ecology* 25(4): 813-817. <<http://www.jstor.org/stable/41239361>>
- van Dam RP & CE Diez. 1997.** Diving behavior of immature hawksbills (*Eretmochelys imbricata*) in a Caribbean reef habitat. *Coral Reefs* 127(16): 133-138. <<https://doi.org/10.1007/BF00993657>>
- Wang Z, M Gerstein & M Snyder. 2009.** RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10(1): 57-63. <<https://doi.org/10.1038/nrg2484>>
- Willmore WG, TE English & KB Storey. 2001.** Mitochondrial gene responses to low oxygen stress in turtle organs. *Copeia* 2001(3): 628-637. <[https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[0628:MGRTLO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[0628:MGRTLO]2.0.CO;2)>
- Wu D & SN Meydani. 2008.** Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. *Journal of Leukocyte Biology* 84(4): 900-914. <<https://doi.org/10.1189/jlb.0108023>>

Wykoff CC, NJ Beasley, PH Watson, KJ Turner, J Pastorek, A Sibtain, GD Wilson, H Turley, KL Talks, PH Maxwell, CW Pugh, PJ Ratcliffe & AL Harris. 2000. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Research* 60(24): 7075-7083. <<https://aacrjournals.org/cancerres/article/60/24/7075/506958/Hypoxia-inducible-Expression-of-Tumor-associated>>

Yeom CJ, L Zeng, Y Goto, A Morinibu, Y Zhu, K Shinomiya, M Kobayashi, S Itasaka, M Yoshimura, CG Hur, H Kakeya, EM Hammond, M Hiraoka & H Harada. 2016. LY6E: a conductor of malignant tumor growth through modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 axis. *Oncotarget* 7(40): 65837. <[10.18632/oncotarget.11670](https://doi.org/10.18632/oncotarget.11670)>

Yu Y, JC Fuscoe, C Zhao, C Guo, M Jia, T Qing, DI Bannon, L Lancashire, W Bao, T Du, H Luo, Z Su, WD Jones, CL Moland, WS Branham, F Qian, B Ning, Y Li, H Hong, L Guo, N Mei, T Shi, KY Wang, RD Wolfinger & C Wang. 2014. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nature Communications* 5(1): 1-11. <<https://doi.org/10.1038/ncomms4230>>

Zhang G, J Zhang, X Wen, C Zhao, H Zhang, X Li & S Yin. 2017. Comparative iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Pelteobagrus vachelli* liver under acute hypoxia: implications in metabolic responses. *Proteomics* 17(17-18): 17-18. <<https://doi.org/10.1002/pmic.201700140>>

Zimmerman LM, GS Clairardin, RT Paitz, JW Hicke, KA LaMagdeleine, LA Vogel & RM 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. <<https://doi.org/10.1242/jeb.078832>>

Recibido el 18 de octubre de 2023
Aceptado el 30 de septiembre de 2024

Editor: Pilar Muñoz Muga

RBMO CITATION STYLE

Rivera-Forero C & J Hernández-Fernández. 2024. Análisis e identificación de genes expresados diferencialmente entre juveniles y adultos de la tortuga caguama (*Caretta caretta*) relacionados con hipoxia y sistema inmune: Primera aproximación. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 59(3): 198-215. <<https://doi.org/10.22370/rbmo.2024.59.3.4869>>