



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE
COMPONENTES CELULARES Y VESICULARES
EN LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA CONCHA
DE LA OSTRA DEL PACÍFICO *Crassostrea*
*gigas***

POR CAMILO LUCIANO MUÑOZ SCHULER

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de
Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía y Patrocinante

Felipe Eleander Aguilera Muñoz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Concepción

Profesora co-Guía

Viviana Isabel Torres Águila

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Concepción

Enero, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
Biomineralización y teoría actual de formación de la concha adulta en moluscos	1
Componentes celulares involucrados en biomineralización de la concha ..	6
Rutas de biomineralización mediadas por microvesículas extracelulares ..	8
Importancia y proyecciones del estudio de la biomineralización de la concha en moluscos	12
Hipótesis y objetivos de la tesis	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
1.1 Obtención de recursos genómicos/transcriptómicos de <i>Crassostrea gigas</i> y marcadores asociados a exosomas	15
1.2 Anotación funcional de los productos génicos (transcritos y proteínas) de <i>Crassostrea gigas</i>	16
1.3 Búsqueda de componentes moleculares asociados a la biogénesis y secreción de exosomas en el genoma de <i>Crassostrea gigas</i>	17
2.1 Búsqueda de componentes de biomineralización contenidos en exosomas en <i>Crassostrea gigas</i>	18
2.2 Análisis de perfiles transcriptómicos de componentes moleculares asociados a exosomas en diferentes tejidos de <i>Crassostrea gigas</i>	19
RESULTADOS	22
Análisis de conservación de secuencias de proteína participantes en biogénesis, tráfico y secreción de exosomas	22
Anotación funcional y búsqueda de términos GO relacionados con exosomas	25
Recopilación de componentes exosomales conservados en <i>C. gigas</i>	27
Identificación de proteínas involucradas en la formación de concha en <i>C. gigas</i> y relacionadas con mecanismos de transporte a través de exosomas	30

Análisis de expresión génica de los componentes moleculares asociados a la biogénesis, tráfico y secreción de exosomas en tejidos relacionados con la biomineralización, y no relacionados con la biomineralización de la concha en <i>C. gigas</i>	33
Perfiles de expresión de componentes de biomineralización directamente e indirectamente involucrados en la formación de concha en <i>C. gigas</i> en tejidos biomineralizantes y no biomineralizantes	37
DISCUSIÓN	43
Conservación de los componentes involucrados en las vías exosomales en <i>C. gigas</i>	44
Los hemocitos como tejido especializado en biogénesis y secreción de exosomas en <i>C. gigas</i>	46
Biomineralización mediada por vesículas en <i>C. gigas</i> y otros animales ...	50
Hemocitos y su rol exosomal en biomineralización	53
CONCLUSIÓN	57
BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1.....	3
Figura 2.....	4
Figura 3.....	27
Figura 4.....	29
Figura 5.....	31
Figura 6.....	32
Figura 7.....	36
Figura 8.....	41
Figura 9.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	24
Tabla II	26
Tabla III	28
Tabla IV	78

RESUMEN

La concha de los moluscos es fabricada por el tejido manto. Análisis de componentes proteicos contenidos en la concha han revelado grupos de proteínas sin péptido señal y grupos con dominios transmembrana, lo que sugiere que algunas proteínas de la concha podrían ser transportadas a través de orgánulos vesiculares. Gracias a la evidencia de vesículas cargadas con componentes de biomineralización liberadas por hemocitos, se ha propuesto que el manto no sería el único tejido involucrado en formación de concha. En este estudio, empleando procedimientos bioinformáticos, se encontró en el genoma de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) la mayoría de los componentes involucrados en la formación y liberación de exosomas, sugiriendo que esta especie de molusco posee el repertorio molecular necesario para producir este tipo de vesículas. Analizando los patrones de expresión génica de componentes exosomales en distintos tejidos, se descubrió que los hemocitos corresponderían al principal tejido formador de exosomas. Asimismo, los patrones de expresión de genes de biomineralización indicarían que en condiciones fisiológicas la formación de concha es llevada a cabo por distintos tejidos, y los hemocitos potencialmente cooperarían en el traslado de ciertos componentes de la concha gracias a su capacidad de infiltrar tejidos y producir exosomas.

INTRODUCCIÓN

Biomíneralización y teoría actual de formación de la concha adulta en moluscos.

La biomíneralización es un proceso empleado por organismos eucariontes y procariontes para producir estructuras mineralizadas con morfologías y propiedades físicas únicas (Wilt, 2005; Cohen et al., 2009; Faivre & Godec, 2015). Este proceso involucra la cristalización controlada de compuestos inorgánicos provenientes desde el medio externo para ser depositados en una matriz orgánica con la que se construirán estructuras resistentes y bien definidas (Wilt et al., 2008; Mass et al., 2017). Estas estructuras se moldean en espacios específicos en los que la forma, el tamaño, la orientación, y el ensamblaje de los componentes inorgánicos y orgánicos (macromoléculas) son controlados a varios niveles moleculares organizados jerárquicamente (Addadi & Weiner 1985; Nindiyasari et al., 2015).

En moluscos, el modelo clásico de biomíneralización de la concha involucra un sistema complejo y coordinado compuesto de una concha externa como fase mineral, del tejido manto como fase tisular y cavidades como fase anexa (Weiner & Addadi, 2011; Marin et al., 2012). Específicamente, la fase mineral se divide en una fase inorgánica que corresponde al 95-99% del peso seco

de la concha (deshidratada) y una fase orgánica que comprende un 0.01-5% del peso total de la concha (hidratada) (Lowenstam & Weiner, 1989). En la mayoría de moluscos, la concha está compuesta por el perióstraco, una capa proteica no calcificada y que no está presente en todas las especies (Beedham & Trueman, 1967; Meenakshi et al., 1974; Checa et al., 2017) (Figura 1).

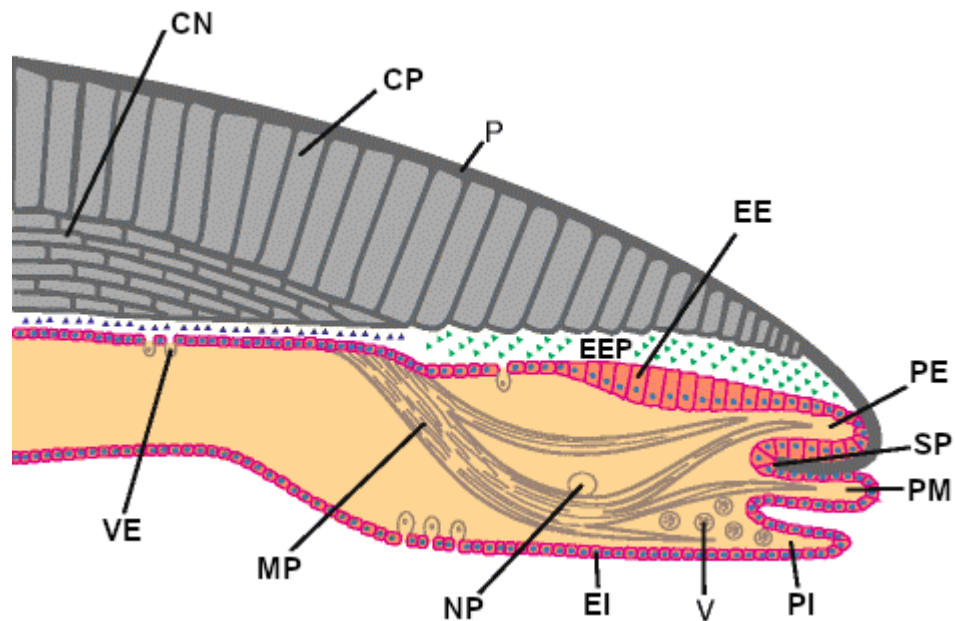


Figura 1. Representación esquemática de un corte transversal a través de la concha y el manto de un molusco bivalvo (modificado desde Kocot et al., 2016). Los triángulos verdes y azules describen macromoléculas orgánicas secretadas por el manto. CN: capa del nácar. CP: capa prismática. P: periostraco. SP: surco periostracal. EEP: espacio extrapalial. PE: pliegue exterior. PM: pliegue medio. PI: pliegue interno. EE: epitelio externo. EI: epitelio interno. NP: nervio palial. MP: músculo palial. V: vesículas. VE: vesículas tipo exosoma.

Bajo el periostraco, se encuentra la capa prismática que confiere cierta flexibilidad a la concha (Checa et al., 2005) debido a su construcción basada en prismas de carbonato de calcio (CaCO_3) alargados y posicionados perpendiculares a la concha (Figura 2A). Por último, la capa más interna de la concha se conoce como foliada o del nácar, dependiendo de la especie de molusco (Dauphin & Denis, 2000; Checa et al., 2006), y suele ser la capa más

dura de la concha (Sun & Bhushan, 2012). La propiedad de dureza de la capa foliada o del nácar se debe a su arquitectura de tabletas hexagonales dispuestas estrechamente y adyacentes unas de otras, formando láminas orientadas de forma paralela a la concha (Figura 2B). Por otra parte, la concha de moluscos también está constituida de una fase orgánica compuesta de macromoléculas como quitina, glicoproteínas sulfatadas y proteínas hidrofóbicas, que se incorporan a la concha durante las distintas etapas del proceso de biomineralización (Weiner & Hood, 1975; Marin & Luquet, 2004).

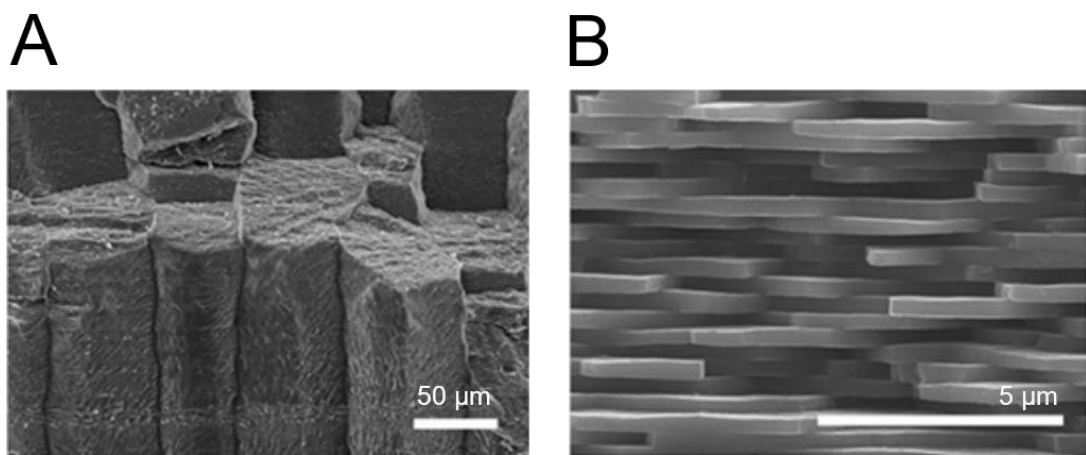


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de la capa prismática (A) y del nácar (B) de la ostra perlífera (*Pinctada fucata*) en orientación perpendicular a la concha (Marie et al., 2012). Es posible observar en A, la morfología prismática y alargada de los bloques de construcción de calcita (polimorfo de carbonato de calcio) de aquella capa, junto a su disposición adyacente entre sí, mientras que en el panel B se observan tabletas hexagonales de aragonita (polimorfo de carbonato de calcio) apiladas una sobre otra y describiendo láminas paralelas a la concha.

La fase tisular del modelo propuesto por Marin et al. (2012), corresponde al tejido conocido como manto. Este tejido es evolutivamente homólogo en todas las especies de moluscos (McDougall & Degnan, 2018) y posee múltiples adaptaciones, como nervios, músculos (Brace, 1977; Eble, 2001) y pliegues con distintos epitelios (Figura 1). El epitelio externo corresponde a una capa de células altamente especializadas ubicadas en la superficie dorsal del manto (epitelio externo; EE en Figura 1) (Bubel et al., 1973; McDougall et al., 2011). El epitelio externo posee la función más importante en la formación de la concha en moluscos, ya que se encarga de secretar las proteínas, polisacáridos y lípidos que componen el andamiaje sobre el cual se construye la concha (Rousseau et al., 2006; Marin et al., 2007; Marie et al., 2007). Incluso, es capaz de regular el flujo de calcio catiónico (Ca^{2+}) que formará parte del componente mineral de la concha (Joubert et al., 2010; Freer et al., 2014; Sillanpää et al., 2018).

Por último, la fase anexa del modelo propuesto por Marin et al., 2012, corresponde a un espacio localizado entre el epitelio externo del manto y la capa foliada o del nácar de la concha, conocido como espacio extrapallial (EEP) (Figura 1). Este espacio se encuentra ocupado por un fluido llamado fluido extrapallial (FEP), compuesto de moléculas inorgánicas y orgánicas que luego formarán parte de la concha (Crenshaw, 1972; Hattan et al., 2001; Lopes-Lima et al., 2005). Estudios sobre el FEP en condiciones de daño de la concha han demostrado que, además de iones y macromoléculas, este fluido

puede contener hemocitos (células inmunitarias de los moluscos) (Huang et al., 2018). Ello ha llevado a relacionar estas células con el proceso de reparación de la concha (Mount et al., 2004); sin embargo, los mecanismos usados por los hemocitos para interactuar y participar en la formación de la concha en moluscos no han sido descritos en profundidad.

Componentes celulares involucrados en biomineralización de la concha.

En el modelo clásico de biomineralización de la concha descrito anteriormente, se pensaba que la matriz orgánica estaba compuesta por pocos componentes. Sin embargo, estudios transcriptómicos y proteómicos recientes han demostrado que la construcción de la concha es más compleja de lo que se conocía hasta el momento, con docenas a cientos de proteínas diversas en estructura y función incorporadas en la concha (Mann et al., 2012; Zhang et al., 2012; Marie et al., 2013; Liu et al., 2015; Arivalagan et al., 2017; Zhao et al., 2018). Lo anterior, abre la posibilidad de que otros componentes aún no identificados participen en la formación de la concha en moluscos. En ese contexto, recientemente se ha descrito la influencia de hemocitos como un componente celular participante de la biomineralización de concha en moluscos (Li et al., 2016). Asimismo, se ha reportado que los hemocitos, gracias a su capacidad de infiltrar tejidos y cavidades mediante diapédesis (Wang et al., 2016), pueden transportar cristales de calcio al frente de mineralización en condiciones de daño de concha (Mount et al., 2004; Johnstone et al., 2015). Así, la participación de hemocitos en el proceso de biomineralización ha sido estudiada principalmente en condiciones de

regeneración de concha posterior a un daño mecánico (Sillanpää et al., 2016). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que los hemocitos también participen en la formación y mantención de la concha en condiciones fisiológicas.

Estudios enfocados en caracterizar los hemocitos han demostrado que existen distintas subpoblaciones, algunas con funciones inmunitarias fagocíticas y otras con funciones de biomineralización, participando en la reparación de la concha mediante el transporte de cristales de CaCO_3 o proteínas involucradas en la formación de concha en moluscos (Mount et al., 2004; Sillanpää et al., 2016; Ivanina et al., 2017; Lau et al., 2017; Huang et al., 2018). Recientemente, se ha sugerido que los hemocitos transportadores de cristales de CaCO_3 estarían llevando a cabo este proceso a través de vesículas extracelulares (Johnstone et al., 2015). Además, los hemocitos no solo transportan cristales de CaCO_3 , sino que también tienen la capacidad de transportar y liberar quitina a través de un mecanismo que también involucraría vesículas (Chan et al., 2018). Otro componente asociado a las vesículas extracelulares de hemocitos descrito recientemente son las moléculas de ARN mensajero (Wang et al., 2018), una característica distintiva de los exosomas en eucariontes (Edgar, 2016).

En resumen, los hemocitos estarían activamente involucrados en la reparación de la concha, participando tanto en la movilización de cristales de CaCO_3 como de otras macromoléculas necesarias para la restauración de la

concha y mediando la liberación de estos componentes a través de mecanismos vesiculares. Pese a ello, la participación de hemocitos en la mantención de la concha es una posibilidad que no ha sido explorada y, pese a que la evidencia sugiere fuertemente que hay componentes vesiculares involucrados en la formación de la concha de moluscos, hasta el momento no se han identificado ni clasificado los mecanismos vesiculares que estarían involucrados en la biomineralización de la concha.

Rutas de biomineralización mediadas por microvesículas extracelulares.

En el contexto de formación de concha en moluscos, las proteínas de biomineralización liberadas desde los tejidos participantes de ese proceso siguen un transporte acorde a la vía secretora clásica de proteínas (Gong et al., 2008), siendo transportadas desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi y luego a la membrana plasmática para ser liberadas al espacio extracelular (Cooper, 2019). Sin embargo, gracias a los hallazgos realizados por Zhang et al. en 2012, se conoce que existen proteínas que forman parte de la matriz orgánica de la concha del molusco bivalvo *Crassostrea gigas* que carecen del péptido señal, sugiriendo que estas proteínas serían transportadas al espacio extrapalial a través de otro mecanismo. Zhang et al. 2012 proponen que, si bien algunas de las proteínas sin péptido señal podrían provenir de restos celulares incrustados en la concha, otras estarían siendo transportadas por mecanismos de secreción no convencionales como translocación a través de poros y/o el transporte mediante orgánulos recubiertos por una membrana plasmática (Rabouille,

2017). En la translocación de proteínas a través de poros, las proteínas libres sin péptido señal son secretadas desde el citosol hacia el espacio extracelular a través de poros que se forman de manera regulada en la membrana plasmática de la célula bajo condiciones de estrés (Kovacs & Miao, 2017). Por otro lado, la liberación de proteínas sin péptido señal a través de orgánulos recubiertos por una membrana plasmática, específicamente desde endosomas, consiste en la secreción de su contenido hacia el espacio extracelular en forma de exosomas (Ras-Carmona et al., 2021). En particular, este último mecanismo de secreción tendría una estrecha relación con procesos de biomineralización. Por ejemplo, se ha observado que en la biomineralización ósea existen proteínas sin péptido señal que son liberadas hacia la matriz ósea a través de exosomas (Ravindran et al., 2008; Ramachandran et al., 2016), lo que entrega luces de la importancia de la liberación de componentes de biomineralización a través de vías vesiculares, especialmente exosomas (Weiner & Addadi, 2011; Addadi & Weiner, 2014).

A grandes rasgos, las vías que utilizan vesículas extracelulares corresponden a mecanismos a través de los cuales las células podrían conferir estabilidad y enviar diversas moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, minerales) a otras células y/o tejidos específicos en microambientes determinados (Johnstone, 2006; Javeed & Mukhopadhyay, 2017). Así, es posible encontrar una amplia diversidad de vesículas, las que varían no solo en su tamaño sino también en su composición (Xu et al., 2016). A su vez, las vesículas pueden estar o no dirigidas hacia un tejido diana específico, lo que está definido principalmente

por la composición molecular de la membrana plasmática que las recubre y los receptores de las células objetivo (Barrès et al., 2010; Rana et al., 2012; Saunderson et al., 2014). Dentro de las vesículas extracelulares, un tipo que ha tomado gran relevancia últimamente por su diversidad funcional son los exosomas. Estos corresponden a microvesículas extracelulares de 20-200 nm que se diferencian de las microvesículas ordinarias en que, en vez de formarse a partir de una gemación de la membrana plasmática de la célula de origen, son producidas a través de un mecanismo endosomal, donde un endosoma es llenado con vesículas intraluminales, que serán posteriormente exocitadas como pequeñas vesículas llamadas exosomas (Cherré, 2016; Edgar, 2016). Otra particularidad de los exosomas, es que pueden ser cargadas con distintos componentes proteicos o nucleicos, permitiendo la existencia de una mayor diversidad funcional de exosomas determinado por su contenido molecular (Smith et al., 2015).

En síntesis, existen vesículas extracelulares capaces de transportar distintos componentes de biomineralización tanto en vertebrados como invertebrados. Con respecto al componente mineral, se han encontrado partículas de los polimorfos amorfos de carbonato (CCA) y fosfato de calcio (FCA) al interior de vesículas extracelulares con características de exosomas (Jacob et al., 2011; Kapustin et al., 2011; Mass et al., 2017; Mir & Goettsch, 2020). Específicamente en moluscos, las vesículas extracelulares transportadoras de CCA, corresponderían a microvesículas y se encontrarían tanto en el manto como en el frente de mineralización (Jacob et al., 2011), siendo

liberadas por las células del manto (McDougall et al., 2011; Sillanpää et al., 2018).

En conjunto, la evidencia entrega pistas acerca de un mecanismo de formación de concha alternativo a la ruta clásica de secreción directa de componentes orgánicos e inorgánicos desde el manto (proteínas con péptido señal). Así, las microvesículas extracelulares también jugarían un rol importante transportando elementos necesarios para la formación de la concha en moluscos. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, los hemocitos son capaces de colaborar en el proceso de biomineralización mediante mecanismos vesiculares, como es el caso de la liberación de carbonato de calcio y quitina desde hemocitos circulantes en el espacio extrapalial (Johnstone et al. 2015; Chan et al., 2018).

Por lo tanto, la evidencia acumulada hasta ahora sugiere que aquellas microvesículas de biomineralización, llamadas vesículas de matriz en vertebrados, podrían tener un origen endosomal (Thouverey et al., 2009). Las vesículas encontradas en tejidos biomineralizantes de moluscos tendrían un tamaño de 20-200 nm e incluso ARNm ha sido encontrado en vesículas liberadas por hemocitos, sugiriendo que las microvesículas observadas en el manto y hemocitos de moluscos podrían tratarse de exosomas (Wang et al., 2018).

Sin embargo, hasta el momento se han reportado únicamente hallazgos exploratorios provenientes de investigaciones centradas en otros propósitos, y no se ha profundizado en la identificación y clasificación de estos tipos vesiculares asociados a la formación de la concha en moluscos. Por aquella razón, se hace primordial indagar más profundamente en los mecanismos vesiculares que estarían participando en aquel grupo de animales.

Importancia y proyecciones del estudio de la biomineralización de la concha en moluscos.

La biomineralización corresponde a un proceso de importancia vital para gran variedad de organismos. Por ejemplo, la concha en moluscos proporciona protección contra depredadores (Fitzer et al., 2015) o la capacidad de controlar su flotabilidad (Finn & Norman, 2010). En el caso de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), el animal modelo que se utilizó en esta investigación, la concha que la protege es fundamental para que pueda lograr un crecimiento adecuado y puedan subsistir sus poblaciones. Para el país, esta especie de molusco tiene una importancia económica considerable, debido a que al año se producen aproximadamente unas 400 toneladas para su comercialización (SERNAPESCA, 2019). Es evidente entonces, que la comprensión en profundidad de los mecanismos biológicos que participan en la biomineralización nos acercará a la resolución de problemáticas tanto del área comercial como en el área de la ecología y conservación.

Dentro de las ventajas que ofrece el uso del molusco bivalvo *Crassostrea gigas* como organismo modelo para esta investigación, se encuentra su alta resistencia a estrés, fácil manipulación, y la presencia de una concha externa, que facilitan el estudio de la biomineralización en el laboratorio (Lee et al., 2008; Samain, 2011). Además, existe una amplia literatura disponible sobre esta especie de molusco (Strand et al., 2011; Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2018; Sokolov et al., 2019), así como recursos genómicos de libre acceso tales como un genoma secuenciado y transcriptomas de diferentes tejidos (Zhang et al., 2012), entregando la posibilidad de realizar diversos análisis bioinformáticos.

Así, a través de aproximaciones bioinformático-moleculares, se logra postular una función vesicular putativa de los hemocitos, sustentada en la alta expresión de genes que codifican para componentes involucrados en biogénesis, tráfico y secreción de exosomas, sugiriendo que los hemocitos serían las células especializadas en liberar exosomas en la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Además, analizando los patrones de expresión de componentes asociados a biomineralización en *C. gigas*, se detectó que algunos tejidos no relacionados con la formación de la concha estarían expresando genes que codifican para proteínas presentes en la concha, sugiriendo la existencia de un sistema de biomineralización colaborativo en condiciones normales, probablemente con fines de mantención de la concha, donde los hemocitos podrían estar recogiendo componentes de

biomineralización desde distintos tejidos para luego liberarlos a través de exosomas en el frente de mineralización en el fluido extrapalial.

Hipótesis y objetivos de la tesis.

A continuación, se describen la hipótesis, el objetivo general y los objetivos específicos de esta tesis:

HIPÓTESIS

Existen componentes vesiculares originados en el manto y/o hemocitos que participarían en el proceso de formación de concha en *Crassostrea gigas*.

OBJETIVO GENERAL

Identificar los componentes moleculares asociados a vesículas presentes en el genoma de *Crassostrea gigas* y su posible participación en la formación de la concha.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar componentes moleculares asociados a la biogénesis, secreción y transporte de vesículas presentes en el genoma de *Crassostrea gigas*.
- 2) Identificar las vías vesiculares activas en los tejidos involucrados en la formación de la concha de *Crassostrea gigas*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Obtención de recursos genómicos/transcriptómicos de *Crassostrea gigas* y marcadores asociados a exosomas.

El ensamblaje, genoma y proteoma de *Crassostrea gigas*, producidos por Zhang et al., 2012, fueron obtenidos desde el repositorio GIGADB (<http://gigadb.org/dataset/100030>). Adicionalmente, se descargaron datos transcriptómicos de tejidos involucrados directamente en el proceso de biomineralización: Manto (tejido completo), borde del manto, manto palial, y hemocitos; y de tejidos no involucrados o indirectamente involucrados en biomineralización: Gónada masculina, glándula digestiva y músculo aductor. Los datos transcriptómicos de tejidos no (o indirectamente) involucrados en biomineralización fueron usados como controles y/o con fines exploratorios.

También, se recopilaron las secuencias de proteínas encontradas en exosomas en humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) y mosca (*Drosophila melanogaster*), depositadas en la base de datos Exocarta (Keerthikumar et al., 2016). Estas proteínas fueron utilizadas para buscar proteínas homólogas en *Crassostrea gigas*.

1.2 Anotación funcional de los productos génicos (transcritos y proteínas) de *Crassostrea gigas*.

La anotación funcional de los productos génicos (transcritos y proteínas) codificados en el genoma de *Crassostrea gigas* se realizó utilizando la *pipeline* bioinformática Trinotate (<https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>). En primer lugar, esta *pipeline* realiza anotaciones basándose en similitud de secuencias de transcritos y proteínas mediante análisis de BLASTX y BLASTP (Bryant et al., 2017) contra la base de datos Swiss-Prot/UniProt (Boutet et al., 2016). Adicionalmente, las proteínas son anotadas a través de modelos de perfiles ocultos de Markov usando el programa HMMER (Finn et al., 2011) y la base de datos Pfam-A (Bateman et al., 2004). Por último, los programas SignalP (Petersen et al., 2011), TMHMM (Krogh et al., 2001), y RNAMMER (Lagesen et al., 2007) realizan predicciones de señales peptídicas, dominios transmembranales y transcritos de ARN ribosomales, respectivamente. Luego utilizando los diferentes resultados de los programas antes mencionados, la *pipeline* Trinotate determina los términos de Ontología de Genes (GO), PFAM, y Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG), generando finalmente un reporte con las anotaciones funcionales para cada transcrito/proteína. El valor de corte para informar la anotación funcional de un transcrito/proteína fue de $1e^{-05}$.

1.3 Búsqueda de componentes moleculares asociados a la biogénesis, tráfico y secreción de exosomas en el genoma de *Crassostrea gigas*.

Usando los componentes descritos en la literatura como involucrados en la biogénesis, tráfico y secreción de exosomas (Hanson & Cashikar, 2012; Colombo et al., 2014; Xu et al., 2016; Pettersen Hesvik & Llorente, 2018), se descargaron las secuencias aminoacídicas de humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) y mosca (*Drosophila melanogaster*), desde la base de datos de proteínas UniProt (<https://www.uniprot.org>).

Con el fin de encontrar proteínas homólogas en *Crassostrea gigas* para los marcadores de biogénesis, tráfico y secreción de exosomas de las especies antes mencionadas, se realizaron análisis de similitud de secuencias usando la herramienta bioinformática BLASTP (Camacho et al., 2009) y el proteoma de *Crassostrea gigas*, considerando un umbral de corte (*E-value*) de 10^{-6} (Pearson, 2013). Para visualizar la identidad entre las proteínas asociadas a biogénesis, tráfico y secreción de exosomas entre *C. gigas*, *H. sapiens*, *M. musculus* y *D. melanogaster*, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias con la herramienta bioinformática MUSCLE (Edgar, 2004). En los casos donde el *E-value* entregado por el análisis de BLASTP fue mayor a 10^{-10} , se realizaron análisis de perfiles ocultos de Markov (HMM) para conocer si la proteína homóloga de *C. gigas* poseía los dominios funcionales necesarios para inferir que ambas proteínas si correspondían a homólogos fidedignos y funcionales.

A través de estos análisis, fue posible determinar qué proteínas involucradas en la biogénesis, tráfico y secreción de exosomas están presentes en *C. gigas*, lo que fue clave para conocer si esta especie de moluscos es capaz de formar y liberar exosomas.

2.1 Búsqueda de componentes de biomineralización contenidos en exosomas en *Crassostrea gigas*.

Usando las secuencias de proteína descargadas previamente desde la base de datos Exocarta para *H. sapiens*, *M. musculus* y *D. melanogaster*, se realizaron análisis bioinformáticos mediante BLASTP en contra del proteoma de *C. gigas* con la finalidad de encontrar proteínas homólogas en Exocarta. Para el análisis se estableció nuevamente un umbral (E-value) de $1e^{-06}$. Esta aproximación permitió identificar proteínas reportadas como contenidas en exosomas en *C. gigas*, lo que se utilizó para conocer si existen componentes proteicos participantes en mecanismos de biomineralización que estén también reportados como contenidos en exosomas.

Luego, se recopilaron desde la literatura componentes proteicos involucrados en la biomineralización de la concha de moluscos (Marie et al., 2011; Aguilera et al., 2014; Mouchi et al., 2016; Feng et al., 2017; Sleight et al., 2019; Iwamoto et al., 2020). Estos componentes fueron clasificados en dos grupos: a) componentes con funciones directas sobre la matriz orgánica de la concha, y b) componentes indirectamente involucrados en la formación de la concha, encargados del transporte y concentración de solutos. Además, se incorporó

un grupo adicional de proteínas, correspondientes a aquellas extraídas desde la concha de *C. gigas* (Zhang et al., 2012).

Finalmente, los grupos de proteínas reportadas en la base de datos Exocarta, involucradas en biomineralización y encontradas en la fase orgánica de la concha, se ubicaron en un diagrama de Venn que permitió identificar componentes participantes de la biomineralización de la concha de moluscos que a la vez estuvieran reportados como contenidos en exosomas en Exocarta.

2.2 Análisis de perfiles transcriptómicos de componentes moleculares asociados a exosomas en diferentes tejidos de *Crassostrea gigas*.

Usando los datos transcriptómicos de los tejidos mencionados en la actividad 1.1, se realizaron análisis de perfiles de expresión para los genes involucrados en la biogénesis, secreción y transporte de exosomas, identificados en la actividad 1.3. Para ello, usando el programa FastQC (Andrews, 2010), se realizó primero un análisis de la calidad de los datos transcriptómicos descargados en la actividad 1.1. De esta manera, elementos como lecturas de baja calidad y adaptadores usados en el proceso de secuenciación, fueron removidos utilizando el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Por último, usando el programa Rcorrector (Song & Florea, 2015), se corrigieron errores de secuenciación y, a través del *script* de Python *FilterUncorrectablePEfastq.py*, se filtraron aquellas secuencias que no pudieron ser corregidas con Rcorrector.

Las secuencias de alta calidad de cada tejido fueron alineadas en contra del genoma de *C. gigas* utilizando el programa STAR (Dobin et al., 2013) y, posteriormente, se calcularon los niveles de expresión génica mediante el programa RSEM (Li & Dewey, 2011). De esta manera los datos transcriptómicos quedaron procesados para ser analizados cuantitativamente, permitiendo conocer los niveles de expresión de los componentes exosomales identificados en la actividad 1.3. Es importante mencionar que la normalización utilizada para estos análisis fue TPM (Transcritos Por Millón). Gracias a que TPM ofrece una normalización del largo de los genes y de la profundidad de secuenciación, es posible realizar comparaciones entre un mismo gen proveniente de distintas muestras (Abbas-Aghababazadeh et al., 2018).

Para analizar la expresión génica de los componentes exosomales en diferentes tejidos de *C. gigas*, se tomaron los datos de niveles de expresión obtenidos a través de RSEM correspondientes a los tejidos biomineralizantes: manto, manto palial, borde del manto y hemocitos; y los tejidos no biomineralizantes: glándula digestiva, gónada masculina y músculo aductor. Después, se seleccionaron los niveles correspondientes solo a los genes de los componentes exosomales a evaluar. Aquellos datos se introdujeron en una hoja de cálculo virtual para luego ser analizados con el paquete de R *pheatmap* y elaborar gráficos de calor (tipo *heatmap*) relacionando la expresión de cada gen con cada uno de los tejidos antes mencionados. Con

esta aproximación, se pudo determinar los perfiles de expresión de los componentes involucrados en la biogénesis, tráfico y secreción de exosomas en tejidos biomineralizantes y no biomineralizantes, permitiendo inferir la capacidad de cada tejido para formar y liberar exosomas.

La misma aproximación antes mencionada se repitió para los genes de los componentes de biomineralización directos e indirectos indicados en la actividad 2.1. De esa manera, a través de gráficos del tipo *heatmap* se observaron los perfiles de expresión de componentes involucrados en la biomineralización de la concha en cada uno de los tejidos de *C. gigas*.

RESULTADOS

Análisis de conservación de secuencias de proteína participantes en la biogénesis, tráfico y secreción de exosomas.

La ruta exosomal posee tres fases: la biogénesis, el tráfico y la secreción. La biogénesis de exosomas requiere la fusión de una vesícula y un endosoma temprano en el citoplasma de la célula. Posteriormente, el endosoma temprano, mediante la invaginación de áreas limitadas de su membrana plasmática, forma vesículas intraluminales y madura hacia un endosoma tardío o cuerpo multivesicular (Wollert & Hurley, 2010). En este proceso varias proteínas se incorporan a la membrana invaginable, mientras que los componentes citosólicos quedan en el interior de la vesícula intraluminal. El proceso de biogénesis también involucra mecanismos de selección de proteínas que serán transportadas en exosomas. Luego en las siguientes fases el cuerpo multivesicular se desplaza hacia la membrana plasmática ayudado por proteínas de tráfico y al fusionarse con la membrana libera las vesículas intraluminales que vienen a ser los exosomas (Pettersen Hessvik & Llorente, 2018). Se han descrito cuatro vías de biogénesis de exosomas, algunas de las cuales actúan de forma complementaria (Aheget et al., 2020). Dentro de aquellas vías, la biogénesis canónica, conocida como dependiente de ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) está

constituida por los complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III, cada uno formado por proteínas específicas que colaboran en los pasos que llevan a la biogénesis de la vesícula intraluminal (Hanson & Cashikar, 2012). Luego, dentro de las vías independientes de ESCRT, están la vía Alix-Sintenina, la vía de la tetraspaninas y la vía de la ceramida (Trajkovic et al., 2008; Baietti et al., 2012; van Niel et al., 2018).

Los resultados de los análisis de similitud de secuencias realizados través de BLASTP, para los componentes reportados en la literatura como involucrados en biogénesis dependiente de ESCRT, biogénesis independiente de ESCRT, tráfico y secreción de exosomas, presentes en el genoma de *Crassostrea gigas* se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Proteínas homólogas presentes en el genoma de *Crassostrea gigas* relacionadas con los procesos de biogénesis, tráfico y secreción de exosomas.

Proceso	Proteína	Gen	Código acceso	Resultado	% Identidad	E-value	Bit-score
Biogénesis dependiente de ESCRT	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	HGS	O14964	CGI_10014480	47.664	0	621
	Tumor susceptibility gene 101 protein	TS101	Q99816	CGI_10028835	48.21	9.34E-123	362
	Multivesicular body subunit 12A	MB12A	Q96EY5	CGI_10002363	26.071	2.34E-18	82.4
	Multivesicular body subunit 12B	MB12B	Q9H7P6	CGI_10002363	35.106	1.57E-39	140
	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	PTN23	Q9H3S7	CGI_10023328	44.313	0	601
	Signal transducing adapter molecule 1	STAM1	Q92783	CGI_10016438	51.174	2.49E-129	394
	Signal transducing adapter molecule 2	STAM2	O75886	CGI_10016438	50	8.86E-133	402
	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	VPS28	Q9UK41	CGI_10014661	68.018	9.27E-108	308
	Vacuolar protein sorting-associated protein 37A	VP37A	Q8NEZ2	CGI_10020778	39.394	6.20E-21	91.7
	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	VP37B	Q9H9H4	CGI_10007138	32.911	2.01E-08	52
	Vacuolar protein sorting-associated protein 37C	VP37C	A5D8V6	CGI_10007138	35.443	9.38E-08	50.4
	Vacuolar protein sorting-associated protein 37D	VP37D	Q86XT2	CGI_10007138	32.051	6.45E-07	47.4
	Vacuolar-sorting protein SNF8	SNF8	Q96H20	CGI_10006279	60.905	3.25E-115	330
	Ubiquitin-associated protein 1	UBAP1	Q9NZ09	CGI_10011291	37.815	1.12E-16	82.8
	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	VPS25	Q9BRG1	CGI_10014146	61.494	6.83E-67	201
	Vacuolar protein-sorting-associated protein 36	VPS36	Q86VN1	CGI_10005412	54.545	7.15E-153	435
	Charged multivesicular body protein 1a	CHM1A	Q9HD42	CGI_10024661	63.265	7.89E-77	228
	Charged multivesicular body protein 1b	CHM1B	Q7LBR1	CGI_10008208	68.912	4.49E-83	244
	Charged multivesicular body protein 2a	CHM2A	O43633	CGI_10007579	79.186	7.75E-113	323
	Charged multivesicular body protein 2b	CHM2B	Q9UQN3	CGI_10028266	59.615	1.31E-80	239
	Charged multivesicular body protein 3	CHMP3	Q9Y3E7	CGI_10003741	65.315	2.65E-91	266
	Charged multivesicular body protein 4a	CHM4A	Q9BY43	CGI_10000381	61.809	2.05E-69	211
	Charged multivesicular body protein 4b	CHM4B	Q9H444	CGI_10000381	68.137	2.13E-78	234
	Charged multivesicular body protein 4c	CHM4C	Q96CF2	CGI_10000381	60.096	1.43E-68	209
	Charged multivesicular body protein 5	CHMP5	Q9NZZ3	CGI_10025617	71.364	7.42E-111	316
	Charged multivesicular body protein 6	CHMP6	Q96FZ7	CGI_10026259	47.027	5.09E-57	177
	IST1 homolog	IST1	P53990	CGI_10028370	65.5	2.08E-93	283
	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	VPS4A	Q9UN37	CGI_10010435	73.529	0	672
	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	VPS4B	O75351	CGI_10010435	76.871	0	692
	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	VTA1	Q9NP79	CGI_10005568	47.697	6.67E-90	270
Biogénesis independiente de ESCRT	Programmed cell death 6-interacting protein	PDC6I	Q8WUM4	CGI_10013051	47.625	0	761
	Syntenin-1	SDCB1	O00560	CGI_10024846	53.103	1.79E-107	313
	Phospholipase D2	PLD2	O14939	CGI_10010622	45.376	6.30E-124	411
	ADP-ribosylation factor 6	ARF6	P62330	CGI_10017557	68.156	2.01E-92	266
	CD9 antigen	CD9	P21926	CGI_10022756	34.272	1.44E-37	130
	CD81 antigen	CD81	P60033	CGI_10012114	34.914	2.18E-27	103
	CD63 antigen	CD63	P08962	CGI_10010785	37.917	5.76E-50	163
	CD82 antigen	CD82	P27701	CGI_10012159	31.641	1.69E-36	130
	CD151 antigen	CD151	P48509	CGI_10012159	41.129	1.06E-68	213
	Tetraspanin-3	TSN3	O60637	CGI_10021703	37.743	6.19E-51	166
	Tetraspanin-6	TSN6	O43657	CGI_10009478	36.437	6.29E-52	169
	Tetraspanin-8	TSN8	P19075	CGI_10012114	35.808	1.82E-30	111
	Flotillin-1	FLOT1	O75955	CGI_10023072	63.397	0	531
	Flotillin-2	FLOT2	Q14254	CGI_10024320	66.75	0	531
	Sphingomyelin phosphodiesterase 2	NSMA	O60906	CGI_10000918	42.935	4.32E-56	183
Tráfico	Ras-related protein Rab-1A	RAB1A	P62820	CGI_10027566	87.379	2.69E-128	359
	Ras-related protein Rab-2B	RAB2B	Q8WUD1	CGI_10010490	92.147	4.43E-134	374
	Ras-related protein Rab-5A	RAB5A	P20339	CGI_10016941	79.07	3.28E-122	344
	Ras-related protein Rab-7A	RAB7A	P51149	CGI_10003329	86.473	5.86E-134	374
	Ras-related protein Rab-8B	RAB8B	Q92930	CGI_10012406	80	1.62E-120	340
	Ras-related protein Rab-9A	RAB9A	P51151	CGI_10016812	67.327	4.04E-99	285
	Ras-related protein Rab-11A	RB11A	P62491	CGI_10003481	87.685	2.07E-130	365
	Ras-related protein Rab-13	RAB13	P51153	CGI_10012406	63.158	6.17E-93	270
	Ras-related protein Rab-14	RAB14	P61106	CGI_10018074	87.907	4.56E-144	400
	Ras-related protein Rab-15	RAB15	P59190	CGI_10021264	55.233	4.83E-70	212
	Ras-related protein Rab-21	RAB21	Q9UL25	CGI_10008385	78.199	1.37E-120	340
	Ras-related protein Rab-22A	RB22A	Q9UL26	CGI_10020438	60.366	2.17E-70	213
	Ras-related protein Rab-27A	RB27A	P51159	CGI_10021960	42.793	1.13E-59	186
	Ras-related protein Rab-27B	RB27B	O00194	CGI_10021960	41.743	2.88E-59	185
	Ras-related protein Rab-31	RAB31	Q13636	CGI_10020438	59.146	1.14E-70	213
	Ras-related protein Rab-35	RAB35	Q15286	CGI_10007134	79.897	1.80E-111	317
	Ras-related protein Rab-43	RAB43	Q86YS6	CGI_10006837	68.966	1.22E-89	261
	Ras-related protein Ral-A	RALA	P11233	CGI_10017805	75.369	6.87E-109	310
	Ras-related protein Ral-B	RALB	P11234	CGI_10017805	71.078	8.17E-101	289
	Src substrate cortactin	CTTN	Q14247	CGI_10012019	53.901	0	531
Secreción	Synaptosomal-associated protein 23	SNP23	O00161	CGI_10015598	54.592	1.01E-65	201
	Synaptotagmin-7	SYT7	O43581	CGI_10026916	52.439	1.1E-118	348
	Syntaxin-1A	STX1A	Q16623	CGI_10025664	79.412	2.22E-138	390
	Syntaxin-5	STX5	Q13190	CGI_10010550	62.937	5.1E-101	306
	Vesicle-associated membrane protein 7	VAMP7	P51809	CGI_10027283	69.444	3.51E-91	267
	Vesicle-associated membrane protein 8	VAMP8	Q9BV40	CGI_10028688	54.118	2.35E-29	104
	Synaptobrevin homolog YKT6	YKT6	O15498	CGI_10005384	55.828	1.25E-66	202

Los parámetros de similitud *E-value*, Bitscore y % identidad, demuestran que los resultados son significativos (Pearson, 2013). Ello sugiere que todas las proteínas sometidas al análisis estarían conservadas en el genoma de *C. gigas*.

En algunos casos, se observó que una proteína homóloga en *C. gigas* presenta similitud de secuencia con varias proteínas de una misma especie reportada en la literatura (Tabla I). Los grupos de proteínas involucrados fueron los componentes de la biogénesis dependiente de ESCRT (VPS37B, VPS37C, VPS37D; STAM1, STAM2; MB12A, MB12B; VPS4A, VPS4B; CHM4A, CHM4B, CHM4C), biogénesis independiente de ESCRT (CD82, CD151) y tráfico (RAB22, RAB31; RAB27A, RAB27B; RALA, RALB). De esta manera, se considerará como proteína homóloga en *C. gigas* aquella que presente un mayor valor de *Bit-score* y menor valor de *E-value*.

Anotación funcional y búsqueda de términos GO relacionados con exosomas.

La anotación funcional del genoma de *C. gigas* entregó 28194 anotaciones asociadas a términos GO, de los cuales 17334 anotaciones provienen a partir de análisis de BLASTX y BLASTP y 11370 anotaciones provenientes desde análisis de presencia de dominios PFAM (Tabla II). De aquellos términos, los seleccionados para el análisis fueron “extracellular vesicle biogénesis” (GO: 0140112), “extracellular exosome biogénesis” (GO:0097734), “secretory vesicle” (GO:0099503), “transport vesicle” (GO:0030133) y “vesicle mediated

transport” (GO:0016192), para los que se encontraron 0, 0, 1, 27 y 197 productos génicos asociados a esos términos GO, respectivamente (Figura 3).

Tabla II. Estadísticas de resultados obtenidos en la anotación funcional de los productos génicos (transcriptos/proteínas) de *C. gigas*. En azul se rotula la cantidad de términos GO encontrados provenientes de BLAST (gene_ontology_blast) y de PFAM (gene_ontology_pfam).

Estadística	N° resultados
transcript_id	28194
#gene_id	28194
prot_id	28027
prot_coords	28027
sprot_Top_BLASTX_hit	17853
sprot_Top_BLASTP_hit	17734
Pfam	17678
gene_ontology_blast	17334
gene_ontology_pfam	11370
TmHMM	5730
SignalP	2337
egglog	292

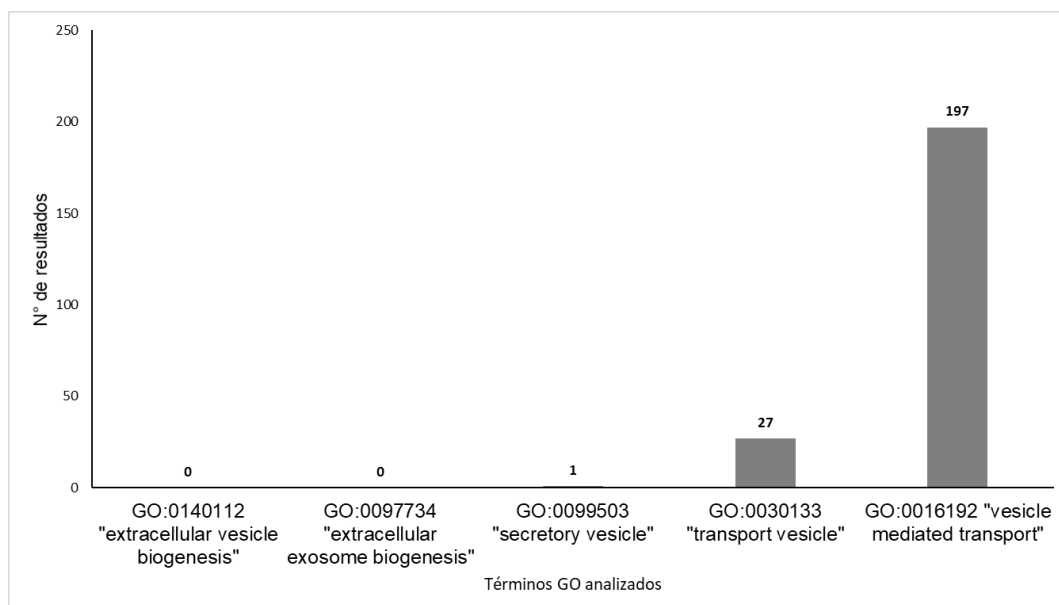


Figura 3. Frecuencia de términos GO “extracellular vesicle biogenesis” (GO: 0140112), “extracellular exosome biogenesis” (GO:0097734), “secretory vesicle” (GO:0099503), “transport vesicle” (GO:0030133) y “vesicle mediated transport” (GO:0016192), encontrados mediante la anotación funcional de los productos génicos (transcriptos/proteínas) de *C. gigas*.

Recopilación de componentes exosomales conservados en *C. gigas*.

Concluido el análisis anterior, se modificó la lista de proteínas homólogas para los componentes exosomales en *C. gigas*, removiendo aquellas proteínas con un bajo grado de similitud de secuencias con las proteínas reportadas en literatura (Tabla III). Con la información de la Tabla III fue posible elaborar un esquema de las rutas exosomales donde estarían actuando proteínas homólogas de los componentes exosomales en *C. gigas* (Figura 4). Los resultados de la anotación funcional no fueron relevantes en relación al objetivo, por lo que no fueron incorporados dentro del esquema elaborado.

Tabla III. Proteínas homólogas de *C. gigas* con un alto grado de similitud de secuencias con componentes exosomales reportados en literatura para humano.

Proceso	Proteína	Gen	Código acceso	Resultado	% Identidad	E-value	Bit-score
Biogénesis dependiente de ESCRT	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	HGS	O14964	CGI_10014480	47.664	0	621
	Tumor susceptibility gene 101 protein	TS101	Q99816	CGI_10028835	48.21	9.34E-123	362
	Multivesicular body subunit 12B	MB12B	Q9H7P6	CGI_10002363	35.106	1.57E-39	140
	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	PTN23	Q9H3S7	CGI_10023328	44.313	0	601
	Signal transducing adapter molecule 2	STAM2	O75886	CGI_10016438	50	8.86E-133	402
	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	VPS28	Q9UK41	CGI_10014661	68.018	9.27E-108	308
	Vacuolar protein sorting-associated protein 37A	VP37A	Q8NEZ2	CGI_10020778	39.394	6.20E-21	91.7
	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	VP37B	Q9H9H4	CGI_10007138	32.911	2.01E-08	52
	Vacuolar-sorting protein SNF8	SNF8	Q96H20	CGI_10006279	60.905	3.25E-115	330
	Ubiquitin-associated protein 1	UBAP1	Q9NZ09	CGI_10011291	37.815	1.12E-16	82.8
	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	VPS25	Q9BRG1	CGI_10014146	61.494	6.83E-67	201
	Vacuolar protein-sorting-associated protein 36	VPS36	Q86VN1	CGI_10005412	54.545	7.15E-153	435
	Charged multivesicular body protein 1a	CHM1A	Q9HD42	CGI_10024661	63.265	7.89E-77	228
	Charged multivesicular body protein 1b	CHM1B	Q7LBR1	CGI_10008208	68.912	4.49E-83	244
	Charged multivesicular body protein 2a	CHM2A	O43633	CGI_10007579	79.186	7.75E-113	323
	Charged multivesicular body protein 2b	CHM2B	Q9UQN3	CGI_10028266	59.615	1.31E-80	239
	Charged multivesicular body protein 3	CHMP3	Q9Y3E7	CGI_10003741	65.315	2.65E-91	266
	Charged multivesicular body protein 4b	CHM4B	Q9H444	CGI_10000381	68.137	2.13E-78	234
	Charged multivesicular body protein 5	CHMP5	Q9NZZ3	CGI_10025617	71.364	7.42E-111	316
	Charged multivesicular body protein 6	CHMP6	Q96FZ7	CGI_10026259	47.027	5.09E-57	177
	IST1 homolog	IST1	P53990	CGI_10028370	65.5	2.08E-93	283
	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	VPS4B	O75351	CGI_10010435	76.871	0	692
	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	VTA1	Q9NP79	CGI_10005568	47.697	6.67E-90	270
Biogénesis independiente de ESCRT	Programmed cell death 6-interacting protein	PDC6I	Q8WUM4	CGI_10013051	47.625	0	761
	Syntenin-1	SDCB1	O00560	CGI_10024846	53.103	1.79E-107	313
	Phospholipase D2	PLD2	O14939	CGI_10010622	45.376	6.30E-124	411
	ADP-ribosylation factor 6	ARF6	P62330	CGI_10017557	68.156	2.01E-92	266
	CD9 antigen	CD9	P21926	CGI_10022756	34.272	1.44E-37	130
	CD63 antigen	CD63	P08962	CGI_10010785	37.917	5.76E-50	163
	CD151 antigen	CD151	P48509	CGI_10012159	41.129	1.06E-68	213
	Tetraspanin-3	TSN3	O60637	CGI_10021703	37.743	6.19E-51	166
	Tetraspanin-6	TSN6	O43657	CGI_10009478	36.437	6.29E-52	169
	Tetraspanin-8	TSN8	P19075	CGI_10012114	35.808	1.82E-30	111
	Flotillin-1	FLOT1	O75955	CGI_10023072	63.397	0	531
	Flotillin-2	FLOT2	Q14254	CGI_10024320	66.75	0	531
	Sphingomyelin phosphodiesterase 2	NSMA	O60906	CGI_10000918	42.935	4.32E-56	183
Tráfico	Ras-related protein Rab-1A	RAB1A	P62820	CGI_10027566	87.379	2.69E-128	359
	Ras-related protein Rab-2B	RAB2B	Q8WUD1	CGI_10010490	92.147	4.43E-134	374
	Ras-related protein Rab-5A	RAB5A	P20339	CGI_10016941	79.07	3.28E-122	344
	Ras-related protein Rab-7A	RAB7A	P51149	CGI_10003329	86.473	5.86E-134	374
	Ras-related protein Rab-8B	RAB8B	Q92930	CGI_10012406	80	1.62E-120	340
	Ras-related protein Rab-9A	RAB9A	P51151	CGI_10016812	67.327	4.04E-99	285
	Ras-related protein Rab-11A	RB11A	P62491	CGI_10003481	87.685	2.07E-130	365
	Ras-related protein Rab-14	RAB14	P61106	CGI_10018074	87.907	4.56E-144	400
	Ras-related protein Rab-15	RAB15	P59190	CGI_10021264	55.233	4.83E-70	212
	Ras-related protein Rab-21	RAB21	Q9UL25	CGI_10008385	78.199	1.37E-120	340
	Ras-related protein Rab-27A	RB27A	P51159	CGI_10021960	42.793	1.13E-59	186
	Ras-related protein Rab-31	RAB31	Q13636	CGI_10020438	59.146	1.14E-70	213
	Ras-related protein Rab-35	RAB35	Q15286	CGI_10007134	79.897	1.80E-111	317
	Ras-related protein Rab-43	RAB43	Q86YS6	CGI_10006837	68.966	1.22E-89	261
	Ras-related protein Ral-A	RALA	P11233	CGI_10017805	75.369	6.87E-109	310
	Src substrate cortactin	CTTN	Q14247	CGI_10012019	53.901	0	531
Secreción	Synaptosomal-associated protein 23	SNP23	O00161	CGI_10015598	54.592	1.01E-65	201
	Synaptotagmin-7	SYT7	O43581	CGI_10026916	52.439	1.1E-118	348
	Syntaxin-1A	STX1A	Q16623	CGI_10025664	79.412	2.22E-138	390
	Syntaxin-5	STX5	Q13190	CGI_10010550	62.937	5.1E-101	306
	Vesicle-associated membrane protein 7	VAMP7	P51809	CGI_10027283	69.444	3.51E-91	267
	Vesicle-associated membrane protein 8	VAMP8	Q9BV40	CGI_10028688	54.118	2.35E-29	104
	Synaptobrevin homolog YKT6	YKT6	O15498	CGI_10005384	55.828	1.25E-66	202

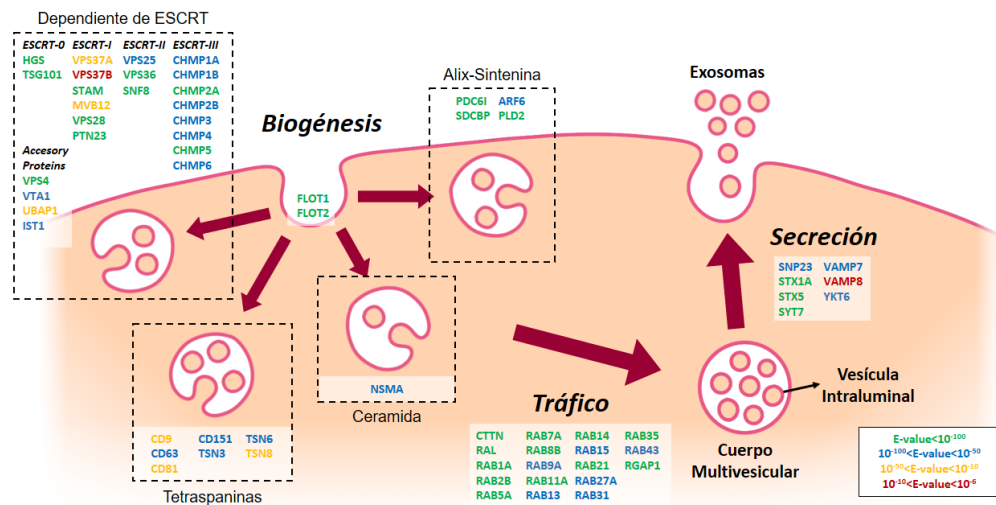


Figura 4. Rutas exosomales conservadas en *Crassostrea gigas* y la ruta exosomal donde estarían participando. Representación esquemática que muestra los procesos de biogénesis, tráfico y secreción de exosomas en un contexto celular. Para cada proceso se explicitan los grupos y componentes correspondientes a biogénesis dependiente e independiente del complejo ESCRT, tráfico de exosomas, y secreción de exosomas. Los componentes rotulados en verde corresponden a proteínas homólogas en *C. gigas* con muy alto grado de similitud (E-value menor a 10^{-100}), mientras que los componentes rotulados en azul corresponden a proteínas homólogas con un grado alto de similitud (E-value menor a 10^{-50} y mayor a 10^{-100}), los componentes rotulados en amarillo corresponden a proteínas homólogas con un mediando grado de similitud (E-value menor a 10^{-10} y mayor a 10^{-50}) y los componentes rotulados en rojo corresponden a posibles homólogos con bajo grado de similitud.

Identificación de proteínas involucradas en la formación de la concha en *Crassostrea gigas* y relacionadas con mecanismos de transporte a través de exosomas.

Para evaluar si algunos componentes proteicos pertenecientes a la concha o que participan del proceso de biomineralización directamente o indirectamente son transportados a través de exosomas, se realizó una búsqueda en la base de datos específica de exosomas llamada Exocarta (Keerthikumar et al., 2016). Para ello, se identificaron proteínas homólogas de *C. gigas* mediante análisis de similitud de secuencias con proteínas de humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) y mosca (*Drosophila melanogaster*) depositadas en la base de datos Exocarta. De esta manera, utilizando un valor de E-value de 10^{-6} como medida de significancia, se obtuvo que existen 4070 proteínas que podrían estar contenidas en vesículas del tipo exosomas de *Crassostrea gigas* (Figura 5)

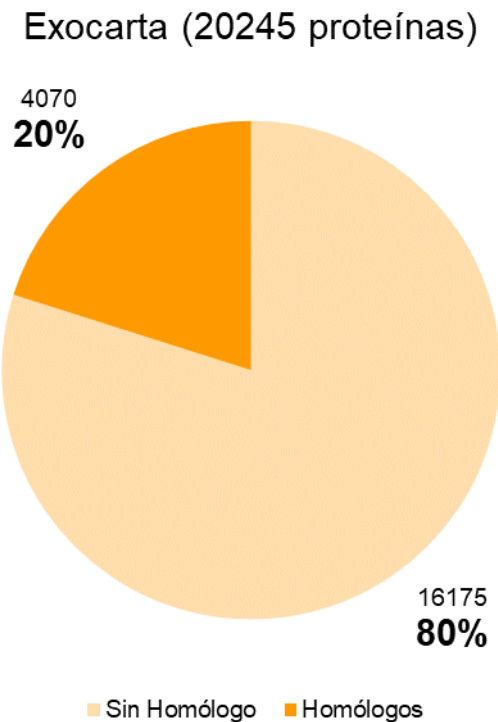


Figura 5. Porcentaje de proteínas homólogas presentes en *Crassostrea gigas* con similitud a secuencias de humano, ratón, y mosca depositadas en la base de datos Exocarta.

Teniendo conocimiento de que existen 4070 proteínas de *C. gigas* que presentan un grado de similitud con proteínas de humano, ratón y mosca reportadas en Exocarta, lo siguiente fue determinar cuáles de esas proteínas están involucradas en el proceso de formación de la concha en esta especie de molusco y cuáles están incrustadas en su concha como componentes de la matriz orgánica. Para ello se elaboró un diagrama de Venn que muestra un número relativamente bajo de proteínas que son contenidas en exosomas y que forman parte del proceso de formación de la concha o que están incrustadas en esta estructura mineralizada en *C. gigas* (Figura 6).

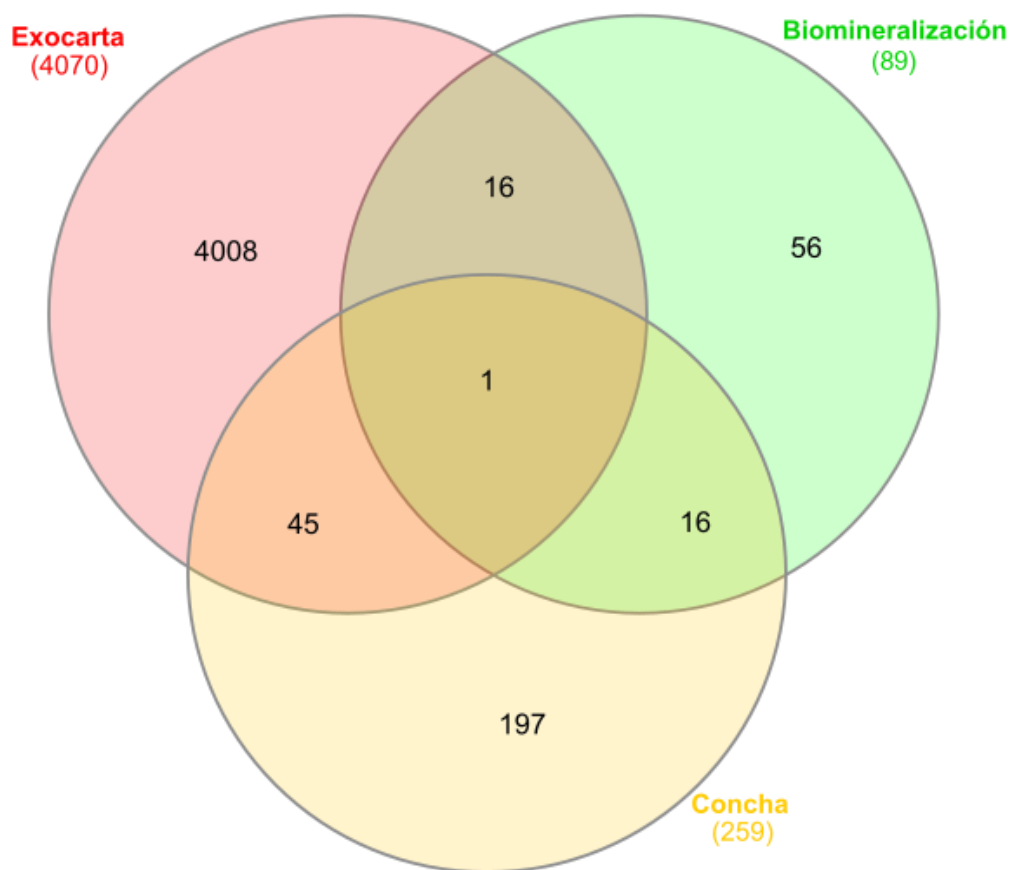


Figura 6. Diagrama de Venn que muestra las proteínas presentes en *C. gigas* con similitud a secuencias de humano, ratón y mosca en la base de datos Exocarta, junto con aquellas proteínas involucradas en el proceso de formación de la concha y que se encuentran incrustadas en la concha de *C. gigas*.

El diagrama de Venn indica que de las 259 proteínas extraídas en la concha de *C. gigas* por Zhang et al. 2012, 46 de ellas poseen secuencias homólogas en la base de datos Exocarta (Tabla IV, Anexo), mientras que de las 89

proteínas involucradas en el proceso de biomineralización de esta especie de molusco, 17 de ellas muestran secuencias homólogas en *Exocarta* (Figura 6).

Lo anterior sugiere que ciertas proteínas que forman parte de la matriz de la concha, como también, proteínas involucradas en el proceso de biomineralización, podrían estar siendo transportadas a través de exosomas en *C. gigas*.

Análisis de expresión génica de los componentes moleculares asociados a la biogénesis, tráfico y secreción de exosomas en tejidos relacionados con la biomineralización, y no relacionados con la biomineralización de la concha en *C. gigas*.

Usando las proteínas homólogas en *C. gigas* para los componentes involucrados en biogénesis, tráfico y secreción de exosomas identificados anteriormente, se estimó la expresión relativa de estos genes en términos de transcritos por millón (TPM). Esto fue realizado en tejidos asociados con la formación de la concha en *C. gigas*, tales como el Manto (M), Manto Palial (MP), Borde del Manto (BM) y Hemocitos (H), así como en tejidos que no presentan una estrecha relación con la formación de la concha (tejidos no biomineralizantes), incluyendo Glándula Digestiva (GD), Gónada Masculina (GM) y Músculo Aductor (MA).

Los resultados obtenidos fueron representados usando gráficos de mapa de calor (o *heatmap*), donde el nivel de expresión de cada gen en cada tejido

está asociado a una baldosa coloreada (Figuras 7 y 8). De la misma manera, cada color está asociado a un valor de expresión génica, representándose de color blanco el menor nivel de expresión y de color rojo el mayor nivel de expresión. Para tener una idea referencial, el valor 1 puede considerarse como baja expresión, entre 1 y 2 como expresión media, y valores sobre 2 como alta expresión. Por otra parte, el dendograma adjunto al costado de cada gráfico (Figuras 7 y 8) agrupa los genes de acuerdo a sus niveles de expresión, encontrándose más cercanos los genes que se expresan de manera similar.

En la Figura 7A, se observa que los componentes involucrados en la biogénesis de exosomas dependiente del complejo ESCRT están expresados en todos los tejidos, lo que indica que esta vía podría estar activa de manera constitutiva en *C. gigas*. La expresión de la mayoría de los componentes dependientes del complejo ESCRT es mayor en hemocitos que en el resto de tejidos evaluados, sugiriendo una mayor biogénesis de exosomas a través del complejo ESCRT en hemocitos. Esto se refleja en la alta expresión del gen TSG101, que codifica para la proteína *Tumor susceptibility gene 101 protein* y se utiliza como un marcador específico de exosomas (Torres et al., 2021). Según el dendograma, el grupo de genes mayormente expresado corresponde principalmente a componentes del complejo ESCRT-III, sugiriendo una mayor presencia de aquel complejo en la célula.

Por otra parte, la Figura 7B muestra los genes involucrados en la biogénesis de exosomas independiente del complejo ESCRT. En este caso, se observa igualmente que todos los componentes moleculares son expresados en todos los tejidos analizados y que también existe una mayor expresión de estos componentes en hemocitos, sugiriendo que estas células podrían también formar exosomas a través de vías independientes del complejo ESCRT. El argumento anterior podría ser sustentado por la alta expresión de genes que codifican para marcadores clásicos de exosomas, tales como *Programmed Cell Death 6-Interacting protein* y CD63 (Torres et al., 2021). Además, el dendograma en la Figura 7B indica que el grupo de más alta expresión en la mayoría de los tejidos corresponde a los genes involucrados en la vía de biogénesis Alix-Sintenina, en desmedro de los genes que forman parte de la ruta de las ceramidas (NSMA) o la ruta de las tetraspaninas (CD9, CD151, TSN6 y TSN8).

Por último, en la Figura 7C se muestra la expresión de genes involucrados en el tráfico y secreción de exosomas. Aquí, la GTPasa RAB7A no se expresa en ningún tejido y la proteína SNARE YKT6 se expresa solo en el manto y glándula digestiva. Sin embargo, el resto de los genes se expresa en todos los tejidos analizados, con especial énfasis en los hemocitos. Aunque no se han identificado marcadores específicos de tráfico y secreción de exosomas, estos resultados sugieren una participación activa de estos genes en el proceso de secreción de exosomas en *C. gigas*.

Los altos niveles de expresión de diferentes genes asociados a exosomas en los hemocitos de *C. gigas* son consistentes con las observaciones de estas células co-localizadas con microvesículas (Wang et al., 2018). Sin embargo, no se había clasificado qué tipo de vesículas extracelulares podrían estar liberando. Por otra parte, acerca de los tejidos borde del manto (BM) y manto palial (MP) solo se había hipotetizado la existencia de mecanismos exosomales (Weiner & Addadi, 2011), por lo que los resultados obtenidos en esta tesis acerca de la alta expresión de componentes relacionados a biogénesis, tráfico y secreción de exosomas en estos tejidos, correspondería a la primera evidencia de que podría haber mecanismos exosomales activos en el manto de los moluscos.

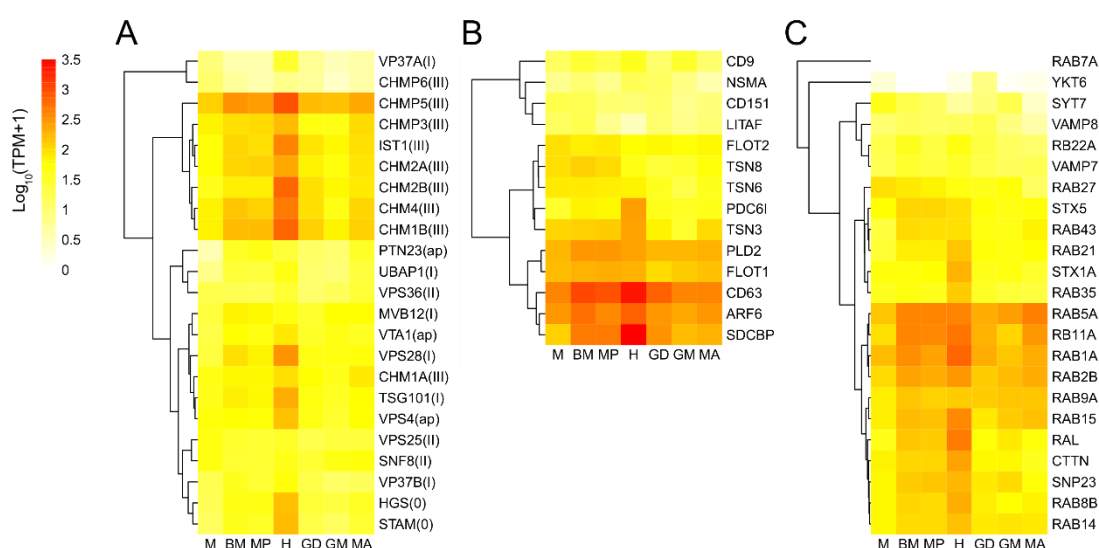


Figura 7. Perfiles de expresión génica de componentes exosomales en distintos tejidos de *Crassostrea gigas*. Los mapas de calor (*heatmaps*) muestran diferentes niveles de expresión, donde el color blanco representa bajos niveles de expresión, mientras que el color rojo representa altos niveles

de expresión génica. A) Perfiles de expresión de genes involucrados en la biogénesis de exosomas dependiente del complejo ESCRT, en paréntesis se indica el complejo ESCRT al que pertenece; B) Perfiles de expresión de genes involucrados en la biogénesis de exosomas independiente del complejo ESCRT; C) Perfiles de expresión de genes involucrados en el tráfico y secreción de exosomas. M: Manto, BM: Borde del Manto, MP: Manto Palial, H: Hemocitos, GD: Glándula Digestiva, GM: Gónada Masculina, y MA: Músculo Aductor.

Perfiles de expresión de componentes de biomineralización directamente e indirectamente involucrados en la formación de concha en *C. gigas* en tejidos biomineralizantes y no biomineralizantes.

Usando los genes involucrados directa e indirectamente en la formación de la concha de *C. gigas* indicados anteriormente, se determinaron los perfiles de expresión génica en los tejidos biomineralizantes Manto (M), Manto Palial (MP), Borde del Manto (BM) y Hemocitos (H), y en tejidos no biomineralizantes Glándula Digestiva (GD), Gónada Masculina (GM) y Músculo Aductor (MA). Los resultados obtenidos fueron representados nuevamente usando gráficos de mapa de calor y expresados en transcritos por millón (TPM).

Los genes involucrados directamente en la formación de la concha corresponden a genes que codifican para proteínas que ejercen su acción directamente en el frente de mineralización, donde se fabrica la concha (Marie et al., 2011; Aguilera et al., 2014; Mouchi et al., 2016; Feng et al., 2017; Sleight

et al., 2019; Iwamoto et al., 2020). En la Figura 8A se observan dos grupos de genes, donde uno muestra altos niveles de expresión en los tejidos biomineralizantes relacionados al manto, mientras que el otro grupo corresponde a genes con muy baja o nula expresión en los mismos tejidos. Dentro del primer grupo, existen varios genes que, además de expresarse altamente en tejidos relacionados al manto, se expresan también en tejidos no biomineralizantes. Dentro de los genes con estas características encontramos EGF-ZP1, Fn2, ChS1D, SPARC, EGF-ZP2, Gigasin6 (Gig6) e IMSP-4 (Figura 8A). Aquellos genes codificantes de proteínas que cumplen un rol de andamio de la matriz orgánica de la concha, presentan altos niveles de expresión génica en tejidos no biomineralizantes (Figura 8A). Esto sugiere que, en condiciones fisiológicas o de mantención de la concha, los tejidos no biomineralizantes cooperarían con este proceso en condiciones fisiológicas

En relación al grupo de genes que presentan bajos niveles de expresión génica en tejidos relacionados con el manto, existe un sub-grupo que codifican para distintas quitina-sintasas, incluyendo ChS3D, ChS8A, ChS3A y ChSC (Figura 8A). Estos genes se expresan exclusivamente en los tejidos no biomineralizantes glándula digestiva y gónada masculina, sugiriendo que los tejidos no biomineralizantes podrían aportar con componentes de la matriz orgánica de la concha de igual manera que el principal tejido responsable de la fabricación de la concha: el manto.

Es importante destacar que los hemocitos muestran perfiles de expresión distintos del resto de los tejidos, donde existen genes con una importancia relevante en los procesos de biomineralización, tales como SPARC y la anhidrasa carbónica PifL2 (Feng et al., 2017).

Por otra parte, los genes involucrados indirectamente en la formación de la concha corresponden a genes que codifican para proteínas que ejercen su acción fuera del sitio donde se forma la concha, como intercambiadores de soluto, por ejemplo. En la Figura 8B se observa que no todos los componentes involucrados indirectamente en la formación de la concha evaluados en esta tesis se expresan en todos los tejidos de *C. gigas*. En primer lugar, existe un grupo de genes con expresión alta y ubicua que corresponden a la proteína de señalización NOTCH2A, el transportador de proteínas SEC61A2 y el transportador de calcio ATP2A1 (Figura 8B). Otros genes con expresión ubicua, pero en un nivel de expresión medio (entre 1 y 2 unidades de $\log_{10}(\text{TPM}+1)$) corresponden al transportador de monocarboxilatos SLC5A8 y al transportador de fosfato SLC17A1 (Figura 8B). Estos resultados indican que los perfiles de expresión de genes indirectamente involucrados en la formación de la concha son diferentes en los hemocitos al compararse con otros tejidos biomineralizantes (M, BM, y MP), siendo expresados por hemocitos únicamente los siguientes genes: NOTCH2A, SEC61A2, ATP2A1, SLC28A3B, SLC28A3A, NLPB, SLC17A1, SLC5A8, NOTCH2C y RGN. Dentro de ellos, los genes ATP2A1, NLPB, y RGN son importantes en la biomineralización basada en carbonato de calcio (CaCO_3), puesto que

participan en la regulación de los niveles de calcio iónico y carbonato de calcio intracelular (Sleight et al., 2019).

Al mismo tiempo, es interesante notar que dentro del grupo de genes expresados en tejidos relacionados al manto (M, BP y MP), los patrones de expresión génica son similares, en algunos casos, al de los tejidos no biomineralizantes (GD, GM, MA). Esto sugiere que, en condiciones fisiológicas o de mantención de la concha, los tejidos no biomineralizantes tendrían la capacidad de acumular elementos necesarios para la formación de la concha.

En conjunto, estos resultados sustentan la hipótesis de que tejidos no relacionados con la biomineralización cooperarían con este proceso, gracias a su capacidad de acumular elementos necesarios para la formación de la concha.

En los tejidos de *C. gigas*, tanto biomineralizantes como no biomineralizantes, se expresan genes identificados como contenidos en exosomas (Figura 8). Dentro de los genes relacionados de manera directa en la formación de la concha encontramos TyrA1.1 y TyrB1 (síntesis de quinonas), ChS8A y ChS8B (síntesis de quitina), SPARC (glucoproteína de matriz) y CHIT2 (reorganización de cadenas de quitina) (Figura 8), mientras que dentro de los genes indirectamente involucrados con la formación de concha se encuentran SLC22A5 (transporte de carnitina), NOTCH2A, NOTCH2B, y NOTCH2C

(señalización), SLC23A1B (transporte de ácido ascórbico), SLC5A8 (transporte de monocarboxilatos), SLC5A9F (transporte de glucosa), ALPL (fosfatasa alcalina) y RGN (síntesis de ácido ascórbico y unión a calcio).

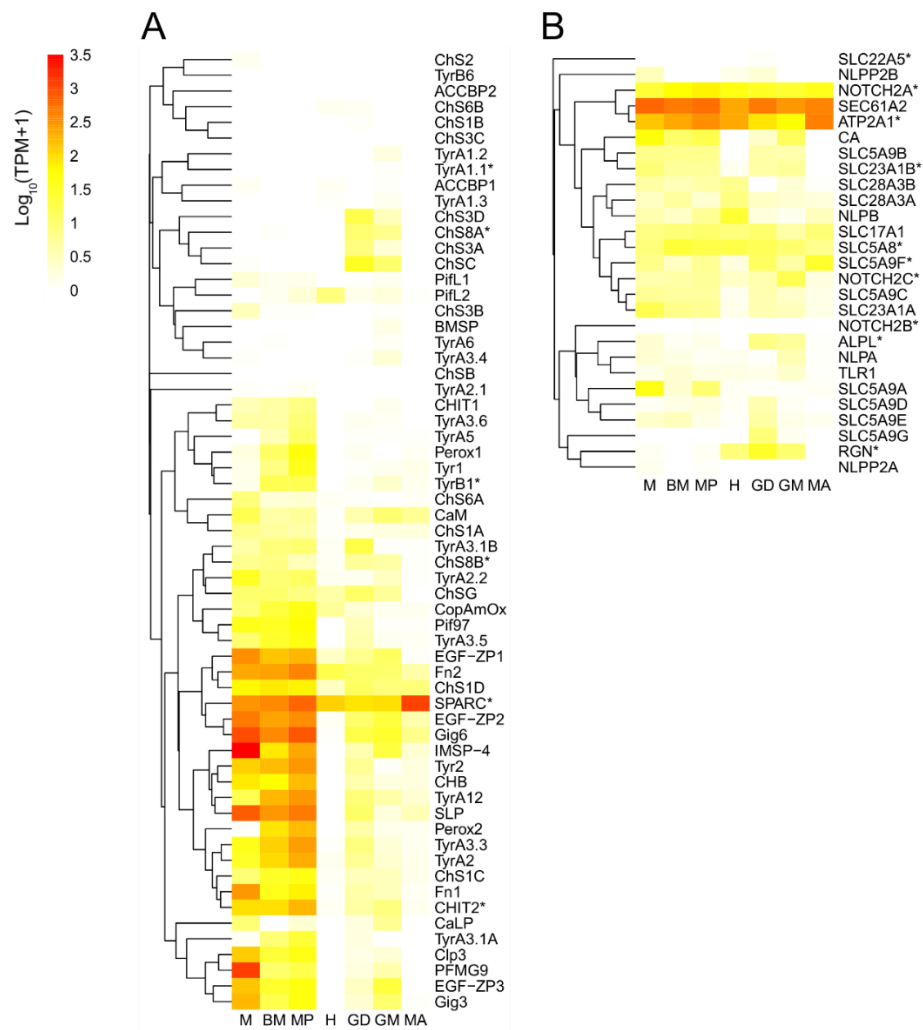


Figura 8. Perfiles de expresión génica en distintos tejidos de componentes involucrados de manera directa e indirecta en la formación de la concha en *C. gigas*. En A) se muestran los genes involucrados directamente en el proceso de formación de la concha, mientras que en B) se muestran los genes involucrados indirectamente. Los genes destacados con un asterisco

corresponden a componentes reportados como contenidos por exosomas en la base de datos Exocarta. M: Manto, BM: Borde del Manto, MP: Manto Palial, H: Hemocitos, GD: Glándula Digestiva, GM: Gónada Masculina y MA: Músculo Aductor.

DISCUSIÓN

El tráfico extracelular mediado por vesículas es un proceso evolutivamente antiguo presente en especies procariotas y eucariotas (Woith et al., 2019). Dentro de las distintas clasificaciones de vesículas extracelulares, los exosomas son un tipo de microvesícula que han llamado la atención debido a su participación en diversas funciones celulares, incluyendo la comunicación paracrina a distancia, el transporte intercelular de ácidos nucleicos y la fabricación de estructuras mineralizadas o biomineralización (Rani et al., 2011; Kapustin et al., 2015; Jella et al., 2018).

Dada la dificultad de desarrollar estudios relacionados con la construcción de estructuras mineralizadas en organismos modelo clásicos, la biomineralización mediada por exosomas ha sido poco estudiada. Sin embargo, el surgimiento del uso de organismos modelos no clásicos ha permitido indagar en procesos poco estudiados hasta el momento. Dentro de estos organismos están los moluscos, quienes son altamente dependientes de la biomineralización y generalmente ostentan estructuras biomineralizadas en forma de conchas o placas. En esta investigación se usó el molusco bivalvo *Crassostrea gigas* con el fin de ahondar en la relación de las vías vesiculares

y el proceso de fabricación o biomineralización de la concha, y poder establecer una función putativa de los exosomas en la formación de la concha.

Conservación de los componentes involucrados en las vías exosomales en *C. gigas*.

Para determinar la presencia de componentes exosomales en *C. gigas*, nos enfocamos en determinar el nivel de conservación de proteínas exosomales previamente descritas en la literatura y que participan en los procesos de biogénesis, tráfico y secreción de exosomas.

Los análisis de similitud de secuencias indican que la mayoría de las proteínas que participan de cada proceso de la vía exosomal, se encuentran presentes en la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Por ejemplo, se encontró que las proteínas de biogénesis dependientes de ESCRT están presentes casi en su totalidad en *C. gigas* (Figura 3). Este resultado tiene concordancia con lo reportado en la literatura sobre el supercomplejo ESCRT, el cual está presente en procariotas y eucariotas (Samson et al., 2008; Field & Dacks, 2009). El supercomplejo ESCRT en arqueas es de una composición más simple y con función asociada a la fisión de corte de membranas (Lindås et al., 2008), mientras que en eucariontes este supercomplejo tiene una estructura modular organizada en diferentes complejos (ESCRT-0, -I, -II, y -III) (Leung et al., 2008). Hubo casos en este estudio donde *C. gigas* solo poseía una proteína homóloga mientras que, en otras especies, como por ejemplo el humano, existen varias proteínas. Estas diferencias podrían ser explicadas debido a los

dos eventos de duplicación de genoma completo que ocurrieron en el ancestro común de los vertebrados (Dehal & Boore, 2005).

Con relación a las vías de biogénesis independientes del complejo ESCRT se observaron distintos grados de conservación. Por ejemplo, para la vía Alix-Sintenina, una proteína homóloga de Alix y una proteína homóloga de Sintenina fueron detectadas en *C. gigas*. Esto se condice a lo observado con la familia de proteínas Bro1, a la cual pertenece Alix (PDC61P) y que está presente en especies de plantas (Shen et al., 2018), levaduras (Wemmer et al., 2011), gusanos planos (Bennett et al., 2020) y mamíferos (Baietti et al., 2012). Sin embargo, Sintenina (SDCBP), hasta el momento solo se había reportado en mamíferos (Baietti et al., 2012) y crustáceos (Tonganunt et al., 2005), siendo este el primer hallazgo en moluscos. Por otro lado, la vía de las tetraspaninas fue la menos conservada en *C. gigas* ya que solo se encontraron proteínas homólogas para los componentes CD9, CD63, CD81, CD151, TSN3, TSN6 y TSN8. Según la literatura, CD63 corresponde a la tetraspanina más ancestral debido a que se ha reportado en animales no bilaterados, tales como cnidarios y esponjas (Müller et al., 1999; Huang et al., 2005). A su vez, se ha propuesto que TSN3 y TSN6 tendrían un origen evolutivo en el ancestro común de los animales, mientras que CD151 en el ancestro común de los animales bilaterados (García-España, 2008).

Los componentes proteicos de la vía de las ceramidas corresponden a las enzimas lipolíticas NSMA (esfingomielinafosfodiesterasas). Estas se han

reportado solo en vertebrados (Clarke et al., 2011) y en arácnidos (Binford et al., 2009), siendo este estudio el primero en reportar un homólogo en moluscos.

Con relación a los componentes asociados al tráfico y secreción de exosomas, la mayoría fueron encontrados en *C. gigas*, por ejemplo, proteínas de la familia de GTPasas Rab. Esta familia participa del tráfico de exosomas y está presente en distintas especies de eucariontes (Pereira-Leal & Seabra, 2001; Nakada-Tsukui et al., 2010) e incluso se ha reportado su presencia en el sistema endomembranoso de arqueas (Surkont & Pereira-Leal, 2016). Asimismo, las proteínas del complejo SNARE se han encontrado en diversas especies de eucariontes y arqueas (Kloepper et al., 2007; Neveu et al., 2020).

Al reunir toda la evidencia anterior, los resultados obtenidos a través de análisis de homología de proteínas exosomales presentes en *Crassostrea gigas* sugieren la presencia de mecanismos exosomales en esta especie de molusco, indicando que los componentes más relevantes en las vías exosomales son conservados y que *C. gigas* tendría la maquinaria molecular necesaria para la formación y liberación de exosomas.

Los hemocitos como tejido especializado en biogénesis y secreción de exosomas en *C. gigas*.

El proceso de biogénesis es el primer paso de la vía exosomal y es fundamental, dado que cambia la trayectoria de la vía endosomal canónica

hacia la exocitosis de su contenido como exosomas, en vez de la función clásica de degradación o reciclaje (Edgar, 2016). Pese a que los componentes específicos que gatillan la conversión de la vía endosomal a exosomal no se han identificado, se conoce que el proceso parece estar regulado en diferentes puntos (Palmulli & van Niel, 2018).

Así, el primer punto de regulación correspondería al cargamento de los exosomas (van Niel et al., 2001). Se ha visto en distintos experimentos que la sobreproducción de proteínas que son transportadas como cargamento exosomal, induce un incremento en la liberación de exosomas (Berson et al., 2001; Theos et al., 2006; Edgar et al., 2014). De acuerdo a nuestros resultados, proteínas transportadas a través de exosomas tales como CD63, SPARC o ATP2A1 están altamente expresadas en los tejidos biomineralizantes Borde del Manto, Manto Palial y Hemocitos de *C. gigas*. Como segunda etapa de regulación, se propone el despacho de proteínas hacia el lumen de endosomas tempranos (Theos et al., 2006). Usualmente, las proteínas que serán exocitadas a través de exosomas son enviadas primero hacia la membrana plasmática y desde ahí recogidas como un endosoma temprano (Theos et al., 2006). Dentro de las proteínas que colaboran en aquel proceso se encuentran las flotilinas (FLOT1, FLOT2), que están encargadas de acumular las proteínas de carga en la membrana para promover su endocitosis (Meister & Tikkanen, 2014). Interesantemente, estas proteínas se encuentran altamente expresadas en todos los tejidos de *C. gigas*. Un tercer punto de regulación es el destino de la proteína que se va a

cargar en el endosoma temprano (Palmulli & van Niel, 2018). En aquel caso, la proteína de unión a Sindecán, Sintenina (SDCBP), se ocupa de reciclar el Sindecán presente en endosomas tempranos, llevándolo de vuelta a la membrana plasmática de la célula (Zimmermann et al., 2005). Sin embargo, al unirse al mismo tiempo con la proteína accesoria de ESCRT Alix (PDC6IP), se induce la incorporación del Sindecán en vesículas intraluminales, para luego ser liberado a través de exosomas (Baietti et al., 2012), mecanismo que a su vez está controlado por el Factor de Ribosilación de ADP6 (ARF6) y Fosfolipasa D2 (PLD2) (Ghossoub et al., 2014). En nuestros resultados, el componente clave Alix se encuentra expresado en todos los tejidos, pero su expresión es especialmente alta en hemocitos, lo que sugiere un rol más específico de este tejido en aquella función y permitiendo funciones como secretar un mayor número de vesículas (Böker et al., 2018) o cargar más proteínas en exosomas (Sun et al., 2019).

En cuanto a las proteínas encargadas de la formación de vesículas intraluminales, existen diversos componentes que regulan aquel proceso y en conjunto, formarían un cuarto punto de regulación que define el destino de un endosoma temprano (Aheget et al., 2020). Dentro de las diferentes rutas de biogénesis, la más conocida es la biogénesis dependiente del supercomplejo ESCRT. La maquinaria ESCRT, compuesta de los complejos 0, I, II, y III comprende los componentes STAM (ESCRT-0), HGS (ESCRT-0), TSG101 (ESCRT-I), que son clave para la formación de exosomas (Colombo et al., 2013). Aquellos componentes, pese a expresarse en todos los tejidos,

muestran un nivel de expresión mucho más alto en hemocitos. A su vez, dentro de las vías independientes del complejo ESCRT, la vía Alix-Sintenina tiene a Alix, SDCBP, ARF6 y PLD2 como reguladores, pudiendo también depender parcialmente de algunos componentes de ESCRT: TSG101 (ESCRT-I), SNF8 (ESCRT-II), CHMP4(ESCRT-III) y VPS4(ap) (Baietti et al., 2012). La mayoría de estos componentes se expresan altamente en hemocitos, a diferencia del resto de tejidos que muestran una expresión más baja de ellos. Por último, la vía de la ceramida está involucrada en la biogénesis independiente de ESCRT a través de la enzima NSMA (Trajkovic et al., 2008) y se ha visto también involucrada de manera regulatoria en la vía de biogénesis independiente de ESCRT Alix-Sintenina (Baietti et al., 2012). La expresión de la enzima NSMA es similar en todos los tejidos analizados; por lo tanto, no se puede inferir un posible rol tejido específico de esta enzima en las vías exosomales de *C. gigas*.

Por último, un quinto punto de regulación correspondería al proceso de traslado y fusión del endosoma tardío con la membrana plasmática, para liberar su contenido como exosomas (Palmulli & van Niel, 2018). En relación a esta fase, se ha demostrado que las GTPasas Rab, RAB2B, RAB5A, RAB9, RAB11, RAB27 y RAB35, son indispensables para que haya liberación de exosomas (Ostrowski et al., 2009; Abrami et al., 2013), junto al efecto promotor de la secreción de exosomas expuesto por Cortactina (CTTN) (Sinha et al., 2016). En *C. gigas*, algunos de estos genes están expresados en una mayor tasa en los tejidos biomineralizantes (Manto, Borde del manto, Manto

pallial, y Hemocitos), lo que podría sugerir que estos tejidos tienen un mayor tráfico vesicular. Por otra parte, se ha reportado que las proteínas del complejo SNARE: VAMP7, YKT6, Sintaxina 5 (STX5) y SNAP23, estimulan la secreción de exosomas (Fader et al., 2009; Gross et al., 2012, Hyenne et al., 2015, Wei et al., 2017). Con respecto a estos genes, los niveles de expresión también son mayores en los tejidos biomineralizantes comparado con los tejidos no biomineralizantes, sugiriendo así, una mayor tasa de secreción de vesículas en el primer tipo de tejidos.

Biomineralización mediada por vesículas en *C. gigas* y otros animales.

Las observaciones obtenidas para los tejidos relativos al manto, principal responsable de la fabricación de la concha en moluscos (Lowenstam & Weiner, 1989), no entregaron suficiente evidencia para concluir un rol destacado de este tejido en la producción y liberación de exosomas. No obstante, existen diferencias en la expresión de componentes exosomales entre el manto completo (M) y sus zonas específicas manto pallial (MP) y borde del manto (BM), donde MP y BM muestran mayor expresión que M. La muestra manto (M), corresponde a una mezcla aleatoria de trozos del tejido completo, incorporando zonas poco o nada envueltas en la formación de concha (Zhang et al., 2012). Su diferencia con las zonas borde del manto y manto pallial, es que estos son sitios especialmente dedicados a la biomineralización (Ivanina et al., 2017; Mao et al, 2019). Complementando la evidencia con nuestros resultados, se puede sugerir que las zonas del manto más involucradas en biomineralización, producirían más exosomas que otras

zonas del manto, dejando abierta la posibilidad de que existan componentes exosomales participando en la biomineralización mediada por el manto.

Se sabe que en otros invertebrados la formación de biomineral está fuertemente ligada a su confinamiento dentro de vesículas (Wilt et al., 2008; Mass et al., 2017). Aquello se debe a que el mecanismo por el cual el carbonato de calcio llega a formar una estructura cristalina ordenada (calcita o aragonita), requiere un paso de nucleación del cristal, donde se forma previamente un polimorfo amorfo altamente inestable (Bots et al., 2012). En esa línea, se ha reportado que los polimorfos amorfos de calcio se pueden estabilizar confinando las partículas dentro de vesículas lipídicas pequeñas y/o ajustando el pH del medio (Tester et al., 2012; Du & Amstad, 2019). Aquello se lograría justamente al incorporar estas partículas dentro de vesículas pequeñas como los exosomas, dado que su tamaño favorecería la estabilización del carbonato de calcio amorfo (van Niel et al., 2018). No obstante, por la dificultad técnica de realizar este tipo de estudios, existe poca evidencia de este mecanismo en la literatura.

El proceso de biomineralización ha sido más estudiado en vertebrados cuya diferencia con el proceso de invertebrados (moluscos) radica principalmente en que el mineral de calcio contiene un anión fosfato en lugar de carbonato (Landis, 1999). Así, en 2015, Shapiro et al., plantearon la posibilidad de que las vesículas de matriz que biomineralizan el hueso de vertebrados, podrían tener un origen endosomal. Para ello, las vesículas de matriz se liberarían

desde condrocitos y osteoblastos en forma de exosomas hacia la matriz ósea, y se adherirían a ella para comenzar el crecimiento del cristal. A pesar de ello, en 2018, Bottini et al., propusieron que las vesículas de matriz tienen su origen primordial a partir de las zonas más apicales de las microvellosidades encontradas en condrocitos y osteoblastos, formándose desde brotes de membrana plasmática con mineral dentro y no desde microvesículas tipo exosoma. De todas formas, los autores establecen que no se puede descartar que las células mineralizantes puedan liberar vesículas originadas de la membrana plasmática de microvellosidades y exosomas de manera concomitante.

Usando la misma lógica y la literatura disponible, es posible hipotetizar un origen similar para lo que serían las “vesículas de matriz” en *Crassostrea gigas*. En el caso de la ostra, se cumplen dos condiciones importantes: 1) las células formadoras de concha encontradas en el epitelio externo del manto poseen microvellosidades (Audino et al., 2015); y 2) en el proteoma de la concha de *Crassostrea gigas* se han encontrado trazas de proteínas citoplasmáticas (Zhang et al., 2012). De cualquier manera, nuestros resultados sugieren la existencia de vías exosomales funcionando en los tejidos de *Crassostrea gigas* y pareciera factible que su función pueda estar relacionada con la formación de la concha.

Hemocitos y su rol exosomal en biomineralización.

Los análisis de expresión génica indican que los hemocitos presentan los mayores niveles de expresión para la mayoría de los componentes exosomales, incluyendo los que se han propuesto como regulatorios de la vía exosomal. Los hemocitos son un tipo de granulocitos y dentro de estos, los neutrófilos han sido relacionados con vías exosomales (Genschmer et al., 2019; Mandujano-Tinoco et al., 2021; Miccoli et al., 2021). Nuestros hallazgos evidencian efectivamente que los hemocitos de *C. gigas* tendrían la capacidad de sintetizar y secretar exosomas, destacándose en esta función sobre otros tejidos de la ostra.

Adicionalmente, nuestros resultados muestran que los hemocitos expresan componentes de biomineralización que se han reportado como transportados al interior de exosomas. Dentro de ese grupo, uno particularmente importante en biomineralización es SPARC, que como proteína tiene la capacidad de unirse al colágeno y a cristales de calcio a la vez, permitiendo el ensamblaje de estructuras biominerales (Termine et al., 1981). Su expresión en hemocitos podría estar ligada a la liberación de este componente a través de exosomas hacia la concha para interactuar con el colágeno presente en ella, pero, además, favorecería el ensamblaje intravesicular de fibras de colágeno como se ha observado en hemocitos de mosca (Martinek et al., 2008). La función de SPARC como chaperona de colágeno (Martinek et al., 2007) podría estar directamente relacionada con la biomineralización de la concha, dado que se ha encontrado que su matriz orgánica contiene aquella molécula (Zhang et al.,

2012). Comparando la tasa de expresión de este gen en todos los tejidos, es notorio que los tejidos involucrados con biomineralización: manto, manto palial, borde del manto y hemocitos, expresan el gen de SPARC en un mayor nivel que los tejidos no biomineralizantes, lo que es consistente con los reportes de otros tejidos biomineralizantes, como el ligamento periodontal, donde se asocia una alta expresión de SPARC con la remodelación de la matriz de biomineralización (Rosset et al., 2017).

Lo anterior corresponde a posibles mecanismos mediante los cuales los hemocitos colaborarían en el proceso de biomineralización mediado por vesículas para componentes formados por ellos. No obstante, un mecanismo adicional que podrían llevar a cabo los hemocitos es el transporte de componentes involucrados en la formación de la concha desde tejidos no biomineralizantes hacia el frente de mineralización. Para ello, los hemocitos que circulan en la hemolinfa podrían valerse de su capacidad de infiltrar cavidades y su rol de producir exosomas para transportar componentes proteicos contenidos en exosomas de tejidos no biomineralizantes, llevarlos al frente de mineralización de la concha y liberarlos al interior de exosomas, lo que podría ocurrir mediante el proceso de transcitosis (Bu et al., 2010; Morad et al., 2019). Adicionalmente, los hemocitos podrían estar entregando a través de los exosomas componentes como microARNs para regular la expresión de ciertos genes en los tejidos con los cuales interactúa (Chen et al., 2017) (Figura 9).

Sin duda, son necesarios estudios posteriores para poder afirmar o refutar lo postulado anteriormente. No obstante, los hemocitos y las vías exosomales ofrecen nuevas proyecciones en lo que respecta a la formación de la concha en moluscos y el proceso de biomineralización en animales. Dentro de estas proyecciones, se podrían desarrollar nuevas estrategias para contrarrestar las patologías que producen defectos en las conchas en los cultivos marinos de bivalvos y, por otra parte, se podría implementar la biomineralización de concha como modelo para indagar en el estudio de enfermedades humanas que involucren biomineralización mediada por exosomas, como la calcificación de músculo liso vascular (Kapustin et al., 2015).

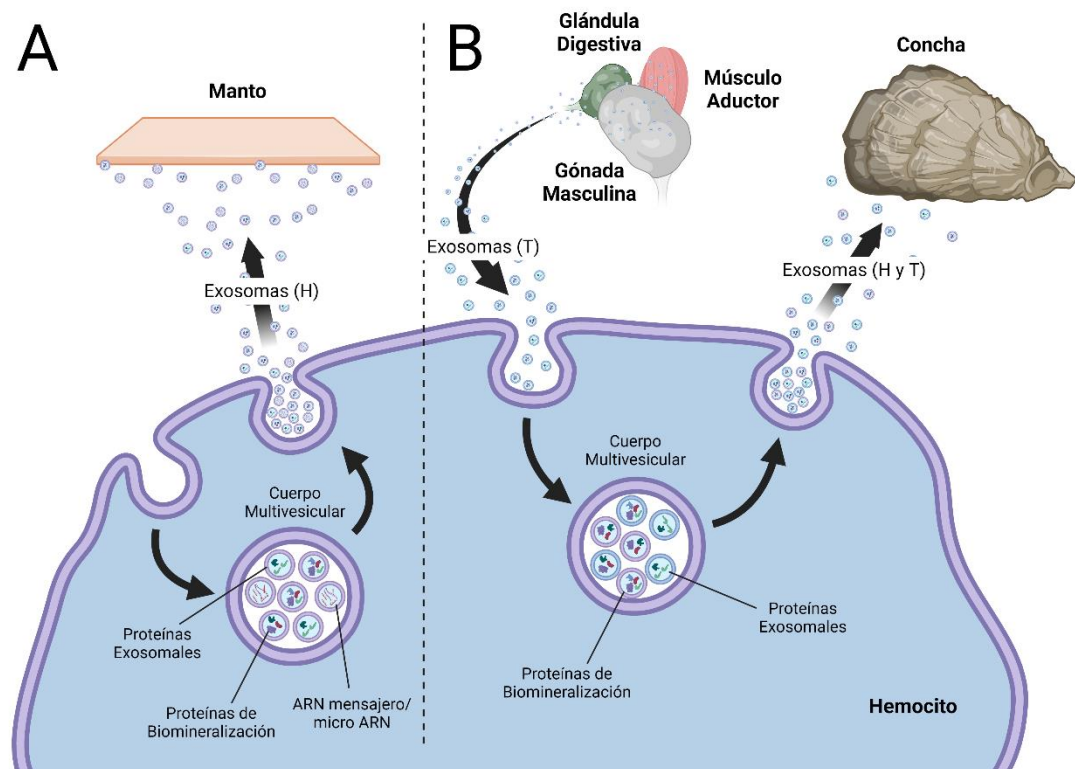


Figura 9. Modelo propuesto para las funciones exosomales desempeñadas por hemocitos. A) Los hemocitos son las células especializadas en formar y liberar exosomas en *C. gigas*, pudiendo transportar proteínas exosomales, proteínas de biomineralización y ARN (ARN mensajero o micro ARN) a través de ellos. Estas moléculas permiten regular las funciones de otros tejidos y también apoyar el proceso de formación de la concha. B) Por otra parte, los hemocitos asisten la biomineralización desde tejidos lejanos a la concha. Mediante transcitosis, estas células recogen exosomas cargados con proteínas de biomineralización provenientes de otros tejidos, se desplazan a través de la hemolinfa y los transportan hacia el frente de mineralización de la concha para que su contenido sea liberado ahí.

Exosomas (H): Exosomas de Hemocitos (membrana índigo), Exosomas (T): Exosomas de Tejidos distintos a hemocitos (membrana celeste).

CONCLUSIONES

Los hallazgos realizados en esta investigación han permitido dilucidar que existen vías exosomales conservadas en el genoma de *Crassostrea gigas*, siendo además expresadas en condiciones fisiológicas. Adicionalmente, se logró determinar que los hemocitos son el tejido con mayor actividad en la función exosomal de la ostra. A raíz de ello, se propone un mecanismo mediante el cual los hemocitos regularían la actividad de los tejidos, y colaborarían con la biomineralización formando y distribuyendo exosomas cargados con proteínas de biomineralización desde tejidos lejanos a la concha, hacia el frente de mineralización. Para ello se valdrían del proceso de transcitosis, y de su capacidad de desplazamiento y formación de exosomas. De cualquier manera, es necesario ahondar más en la investigación a través de experimentos que permitan responder preguntas como la forma en que se estarían cargando los componentes de biomineralización en los hemocitos o si es posible formar mineral al interior de estos exosomas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas-Aghababazadeh, F., Li, Q., & Fridley, B. L. (2018). Comparison of normalization approaches for gene expression studies completed with high-throughput sequencing. *PloS One*, 13(10), e0206312.
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M. J., Krantz, B. A., Leppla, S. H., & van der Goot, F. G. (2013). Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell Reports*, 5(4), 986-996.
- Addadi, L., & Weiner, S. (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 4110-4114.
- Addadi, L., & Weiner, S. (2014). Biomineralization: mineral formation by organisms. *Physica Scripta*, 89(9), 098003.
- Aguilera, F., McDougall, C., & Degnan, B. M. (2014). Evolution of the tyrosinase gene family in bivalve molluscs: independent expansion of the mantle gene repertoire. *Acta Biomaterialia*, 10(9), 3855-3865.
- Aheget, H., Tristán-Manzano, M., Mazini, L., Cortijo-Gutierrez, M., Galindo-Moreno, P., Herrera, C., ... & Benabdellah, K. (2020). Exosome: a new player in translational nanomedicine. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 2380.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

- Arivalagan, J., Yarra, T., Marie, B., Sleight, V. A., Duvernois-Berthet, E., Clark, M. S., ... & Berland, S. (2017). Insights from the shell proteome: biomineralization to adaptation. *Molecular Biology and Evolution*, 34(1), 66-77.

- Audino, J. A., Marian, J. E. A., Wanninger, A., & Lopes, S. G. (2015). Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. *BMC Developmental Biology*, 15(1), 1-22.

- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., ... & David, G. (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677-685.

- Barrès, C., Blanc, L., Bette-Bobillo, P., André, S., Mamoun, R., Gabius, H. J., & Vidal, M. (2010). Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*, 115(3), 696-705.

- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., ... & Studholme, D. J. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_1), D138-D141.

- Beedham, G. E., & Trueman, E. R. (1967). The relationship of the mantle and shell of the Polyplacophora in comparison with that of other Mollusca. *Journal of Zoology*, 151(2), 215-231.

- Bennett, A. P., de la Torre-Escudero, E., & Robinson, M. W. (2020). Helminth genome analysis reveals conservation of extracellular vesicle biogenesis pathways but divergence of RNA loading machinery between phyla. *International Journal for Parasitology*, 50(9), 655-661.

- Berson, J. F., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., & Marks, M. S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Molecular Biology of the Cell*, 12(11), 3451-3464.

- Binford, G. J., Bodner, M. R., Cordes, M. H., Baldwin, K. L., Rynerson, M. R., Burns, S. N., & Zobel-Thropp, P. A. (2009). Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Molecular Biology and Evolution*, 26(3), 547-566.

- Böker, K. O., Lemus-Diaz, N., Ferreira, R. R., Schiller, L., Schneider, S., & Gruber, J. (2018). The impact of the CD9 tetraspanin on lentivirus infectivity and exosome secretion. *Molecular Therapy*, 26(2), 634-647.

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

- Bots, P., Benning, L. G., Rodriguez-Blanco, J. D., Roncal-Herrero, T., & Shaw, S. (2012). Mechanistic insights into the crystallization of amorphous calcium carbonate (ACC). *Crystal Growth & Design*, 12(7), 3806-3814.

- Bottini, M., Mebarek, S., Anderson, K. L., Strzelecka-Kiliszek, A., Bozycki, L., Simão, A. M. S., ... & Buchet, R. (2018). Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1862(3), 532-546.

- Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., Schneider, M., Bansal, P., Bridge, A. J., ... & Xenarios, I. (2016). UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt KnowledgeBase: how to use the entry view. In *Plant Bioinformatics* (pp. 23-54). Humana Press, New York, NY.

- Brace, R. C. (1977). The functional anatomy of the mantle complex and columellar muscle of tectibranch molluscs (Gastropoda: Opisthobranchia), and its bearing on the evolution of opisthobranch organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 277(951), 1-56.

- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., ... & Bateman, J. (2017). A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Reports*, 18(3), 762-776.

- Bu, H. F., Wang, X., Tang, Y., Koti, V., & Tan, X. D. (2010). Toll-like receptor 2-mediated peptidoglycan uptake by immature intestinal epithelial cells from apical side and exosome-associated transcellular transcytosis. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3), 658-668.
- Bubel, A. (1973). An electron-microscope investigation of the cells lining the outer surface of the mantle in some marine molluscs. *Marine Biology*, 21(3), 245-255.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421.
- Chan, V. B. S., Johnstone, M. B., Wheeler, A. P., & Mount, A. S. (2018). Chitin facilitated mineralization in the Eastern oyster. *Frontiers in Marine Science*, 5, 347.
- Chen, H., Xin, L., Song, X., Wang, L., Wang, W., Liu, Z., ... & Song, L. (2017). A norepinephrine-responsive miRNA directly promotes CgHSP90AA1 expression in oyster haemocytes during desiccation. *Fish & shellfish immunology*, 64, 297-307.
- Checa, A. G., Rodríguez-Navarro, A. B., & Esteban-Delgado, F. J. (2005). The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves. *Biomaterials*, 26(32), 6404-6414.
- Checa, A. G., Esteban-Delgado, F. J., & Rodríguez-Navarro, A. B. (2006). Crystallographic structure of the foliated calcite of bivalves. *Journal of Structural Biology*, 157(2), 393-402.
- Checa, A. G., Vendrasco, M. J., & Salas, C. (2017). Cuticle of Polyplacophora: structure, secretion, and homology with the periostracum of conchiferans. *Marine Biology*, 164(4), 64.
- Cherré, S. (2016). Cell derived microvesicles: Novel preparative and characterization methods (Doctoral dissertation, DTU Nanotech).

- Clarke, C. J., Wu, B. X., & Hannun, Y. A. (2011). The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections. *Advances in Enzyme Regulation*, 51(1), 51.
- Cohen, A. L., McCorkle, D. C., de Putron, S., Gaetani, G. A., & Rose, K. A. (2009). Morphological and compositional changes in the skeletons of new coral recruits reared in acidified seawater: Insights into the biomineralization response to ocean acidification. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 10(7).
- Colombo, M., Moita, C., Van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., ... & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24), 5553-5565.
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255-289.
- Cooper, G. (2019). Protein Sorting and Transport. In *The Cell: A Molecular Approach* (8th ed., pp. 402–404). Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press.
- Crenshaw, M. A. (1972). The inorganic composition of molluscan extrapallial fluid. *The Biological Bulletin*, 143(3), 506-512.
- Dauphin, Y., & Denis, A. (2000). Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126(3), 367-377.
- Dehal, P., & Boore, J. L. (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biology*, 3(10), e314.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.

- Du, H., & Amstad, E. (2020). Water: How does it influence the CaCO₃ formation?. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(5), 1798-1816.

- Eble, A. F. (2001). Chapter 4. Anatomy and histology of *Mercenaria mercenaria*. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 31, pp. 117-220). Elsevier.

- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.

- Edgar, J. R., Eden, E. R., & Futter, C. E. (2014). Hrs-and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic*, 15(2), 197-211.

- Edgar, J. R. (2016). Q&A: What are exosomes, exactly?. *BMC Biology*, 14(1), 1-7.

- Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B., & Colombo, M. I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(12), 1901-1916.

- Faivre, D., & Godec, T. U. (2015). From bacteria to mollusks: the principles underlying the biomineralization of iron oxide materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(16), 4728-4747.

- Feng, D., Li, Q., Yu, H., Kong, L., & Du, S. (2017). Identification of conserved proteins from diverse shell matrix proteome in *Crassostrea gigas*: characterization of genetic bases regulating shell formation. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.

- Field, M. C., & Dacks, J. B. (2009). First and last ancestors: reconstructing evolution of the endomembrane system with ESCRTs, vesicle coat proteins, and nuclear pore complexes. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(1), 4-13.

- Finn, J. K., & Norman, M. D. (2010). The argonaut shell: gas-mediated buoyancy control in a pelagic octopus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1696), 2967-2971.

- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2), W29-W37.

- Fitzer, S. C., Vittert, L., Bowman, A., Kamenos, N. A., Phoenix, V. R., & Cusack, M. (2015). Ocean acidification and temperature increase impact mussel shell shape and thickness: problematic for protection?. *Ecology and Evolution*, 5(21), 4875-4884.

- Freer, A., Bridgett, S., Jiang, J., & Cusack, M. (2014). Biomineral proteins from *Mytilus edulis* mantle tissue transcriptome. *Marine Biotechnology*, 16(1), 34-45.

- Genschmer, K. R., Russell, D. W., Lal, C., Szul, T., Bratcher, P. E., Noerager, B. D., ... & Blalock, J. E. (2019). Activated PMN exosomes: pathogenic entities causing matrix destruction and disease in the lung. *Cell*, 176(1-2), 113-126.

- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C. B., Bouchet, J., Vitale, N., ... & Zimmermann, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nature Communications*, 5(1), 1-12.

- Gong, N., Li, Q., Huang, J., Fang, Z., Zhang, G., Xie, L., & Zhang, R. (2008). Culture of outer epithelial cells from mantle tissue to study shell matrix protein secretion for biomineralization. *Cell and Tissue Research*, 333(3), 493-501.

- Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., & Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(10), 1036-1045.

- Hanson, P. I., & Cashikar, A. (2012). Multivesicular body morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 337-362.

- Hattan, S. J., Laue, T. M., & Chasteen, N. D. (2001). Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4461-4468.

- Huang, S., Yuan, S., Dong, M., Su, J., Yu, C., Shen, Y., ... & Xu, A. (2005). The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell–cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics*, 86(6), 674-684.

- Huang, J., Li, S., Liu, Y., Liu, C., Xie, L., & Zhang, R. (2018). Hemocytes in the extrapallial space of *Pinctada fucata* are involved in immunity and biomineralization. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.

- Hyenne, V., Apaydin, A., Rodriguez, D., Spiegelhalter, C., Hoff-Yoessle, S., Diem, M., ... & Labouesse, M. (2015). RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *Journal of Cell Biology*, 211(1), 27-37.

- Ivanina, A. V., Falfushynska, H. I., Beniash, E., Piontkivska, H., & Sokolova, I. M. (2017). Biomineralization-related specialization of hemocytes and mantle tissues of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*, 220(18), 3209-3221.

- Iwamoto, S., Shimizu, K., Negishi, L., Suzuki, N., Nagata, K., & Suzuki, M. (2020). Characterization of the chalky layer-derived EGF-like domain-containing protein (CgELC) in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Structural Biology*, 212(1), 107594.

- Javeed, N., & Mukhopadhyay, D. (2017). Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: a comprehensive review. *Journal of Biomedical Research*, 31(5), 386.

- Jacob, D. E., Wirth, R., Soldati, A. L., Wehrmeister, U., & Schreiber, A. (2011). Amorphous calcium carbonate in the shells of adult Unionoida. *Journal of Structural Biology*, 173(2), 241-249.

- Jella, K. K., Nasti, T. H., Li, Z., Malla, S. R., Buchwald, Z. S., & Khan, M. K. (2018). Exosomes, their biogenesis and role in inter-cellular communication, tumor microenvironment and cancer immunotherapy. *Vaccines*, 6(4), 69.

- Johnstone, R. M. (2006). Exosomes biological significance: a concise review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 36(2), 315-321.

- Johnstone, M. B., Gohad, N. V., Falwell, E. P., Hansen, D. C., Hansen, K. M., & Mount, A. S. (2015). Cellular orchestrated biomineralization of crystalline composites on implant surfaces by the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 463, 8-16.

- Joubert, C., Piquemal, D., Marie, B., Manchon, L., Pierrat, F., Zanella-Cléon, I., ... & Montagnani, C. (2010). Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. *BMC Genomics*, 11(1), 613.

- Kapustin, A. N., Davies, J. D., Reynolds, J. L., McNair, R., Jones, G. T., Sidibe, A., ... & Shanahan, C. M. (2011). Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circulation Research*, 109(1), e1-e12.

- Kapustin, A., Thorngren, R., Turzillo, A., & Wang, Z. (2015). Fermionic symmetry protected topological phases and cobordisms. *Journal of High Energy Physics*, 2015(12), 1-21.

- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., ... & Gangoda, L. (2016). ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 688-692.

- Kloepper, T. H., Kienle, C. N., & Fasshauer, D. (2007). An elaborate classification of SNARE proteins sheds light on the conservation of the eukaryotic endomembrane system. *Molecular Biology of the Cell*, 18(9), 3463-3471.

- Kocot, K. M., Aguilera, F., McDougall, C., Jackson, D. J., & Degnan, B. M. (2016). Sea shell diversity and rapidly evolving secretomes: insights into the evolution of biomineralization. *Frontiers in Zoology*, 13(1), 23.
- Kovacs, S. B., & Miao, E. A. (2017). Gasdermins: effectors of pyroptosis. *Trends in Cell Biology*, 27(9), 673-684.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567-580.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Stærfeldt, H. H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3100-3108.
- Landis, W. J. (1999). The nature of calcium phosphate in mineralizing vertebrate tissues. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 144(1), 185-188.
- Lau, Y. T., Sussman, L., Espinosa, E. P., Katalay, S., & Allam, B. (2017). Characterization of hemocytes from different body fluids of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Fish & Shellfish Immunology*, 71, 372-379.
- Lee, S. W., Kim, G. H., & Choi, C. S. (2008). Characteristic crystal orientation of folia in oyster shell, *Crassostrea gigas*. *Materials Science and Engineering: C*, 28(2), 258-263.
- Leung, K. F., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic*, 9(10), 1698-1716.
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 323.

- Li, S., Liu, Y., Liu, C., Huang, J., Zheng, G., Xie, L., & Zhang, R. (2016). Hemocytes participate in calcium carbonate crystal formation, transportation and shell regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish & shellfish immunology*, 51, 263-270.
- Lindås, A. C., Karlsson, E. A., Lindgren, M. T., Ettema, T. J., & Bernander, R. (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48), 18942-18946.
- Liu, C., Li, S., Kong, J., Liu, Y., Wang, T., Xie, L., & Zhang, R. (2015). In-depth proteomic analysis of shell matrix proteins of *Pinctada fucata*. *Scientific Reports*, 5(1), 1-14.
- Lopes-Lima, M., Ribeiro, I., Pinto, R. A., & Machado, J. (2005). Isolation, purification and characterization of glycosaminoglycans in the fluids of the mollusc *Anodonta cygnea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(3), 319-326.
- Lowenstam, H. A., & Weiner, S. (1989). *On biomineralization*. Oxford University Press on Demand.
- Mandujano-Tinoco, E. A., Sultan, E., Ottolenghi, A., Gershoni-Yahalom, O., & Rosental, B. (2021). Evolution of Cellular Immunity Effector Cells; Perspective on Cytotoxic and Phagocytic Cellular Lineages. *Cells*, 10(8), 1853.
- Mann, K., Edsinger-Gonzales, E., & Mann, M. (2012). In-depth proteomic analysis of a mollusc shell: acid-soluble and acid-insoluble matrix of the limpet *Lottia gigantea*. *Proteome Science*, 10(1), 28.
- Mao, J., Zhang, W., Wang, X., Song, J., Yin, D., Tian, Y., ... & Chang, Y. (2019). Histological and expression differences among different mantle regions of the yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) provide insights into the molecular mechanisms of biomineralization and pigmentation. *Marine Biotechnology*, 21(5), 683-696.
- Marie, B., Luquet, G., Pais De Barros, J. P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., ... & Marin, F. (2007). The shell matrix of the freshwater

mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida) involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization. The FEBS Journal, 274(11), 2933-2945.

- Marie, B., Zanella-Cléon, I., Guichard, N., Becchi, M., & Marin, F. (2011). Novel proteins from the calcifying shell matrix of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Marine Biotechnology, 13(6), 1159-1168.
- Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Belliard, C., Piquemal, D., ... & Montagnani, C. (2012). Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(51), 20986-20991.
- Marie, B., Jackson, D. J., Ramos-Silva, P., Zanella-Cléon, I., Guichard, N., & Marin, F. (2013). The shell-forming proteome of *Lottia gigantea* reveals both deep conservations and lineage-specific novelties. The FEBS Journal, 280(1), 214-232.
- Marin, F., & Luquet, G. (2004). Molluscan shell proteins. Comptes Rendus Palevol, 3(6-7), 469-492.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., & Medakovic, D. (2007). Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. Current Topics in Developmental Biology, 80, 209-276.
- Marin, F., Le Roy, N., & Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusc shell. Frontiers in Bioscience, 4(1099), 125.
- Martinek, N., Shahab, J., Sodek, J., & Ringuette, M. (2007). Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone?. Journal of Dental Research, 86(4), 296-305.
- Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M., & Ringuette, M. (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. Journal of Cell Science, 121(10), 1671-1680.

- Mass, T., Giuffre, A. J., Sun, C. Y., Stifler, C. A., Frazier, M. J., Neder, M., ... & Gilbert, P. U. (2017). Amorphous calcium carbonate particles form coral skeletons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(37), E7670-E7678.

- McDougall, C., Green, K., Jackson, D. J., & Degnan, B. M. (2011). Ultrastructure of the mantle of the gastropod *Haliotis asinina* and mechanisms of shell regionalization. *Cells Tissues Organs*, 194(2-4), 103-107.

- McDougall, C., & Degnan, B. M. (2018). The evolution of mollusc shells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 7(3), e313.

- Meenakshi, V. R., Martin, A. W., & Wilbur, K. M. (1974). Shell repair in *Nautilus macromphalus*. *Marine Biology*, 27(1), 27-35.

- Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view. *Membranes*, 4(3), 356-371.

- Miccoli, A., Picchietti, S., Fausto, A. M., & Scapigliati, G. (2021). Evolution of immune defence responses as incremental layers among Metazoa. *The European Zoological Journal*, 88(1), 44-57.

- Mir, B., & Goettsch, C. (2020). Extracellular vesicles as delivery vehicles of specific cellular cargo. *Cells*, 9(7), 1601.

- Morad, G., Carman, C. V., Hagedorn, E. J., Perlin, J. R., Zon, L. I., Mustafaoglu, N., ... & Moses, M. A. (2019). Tumor-derived extracellular vesicles breach the intact blood–brain barrier via transcytosis. *ACS nano*, 13(12), 13853-13865.

- Mouchi, V., Lartaud, F., Guichard, N., Immel, F., De Rafélis, M., Broussard, C., ... & Marin, F. (2016). Chalky versus foliated: a discriminant immunogold labelling of shell microstructures in the edible oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 163(12), 1-15.

- Mount, A. S., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P., & Snider, D. (2004). Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science*, 304(5668), 297-300.

- Müller, W. E., Wimmer, W., Schatton, W., Böhm, M., Batel, R., & Filic, Z. (1999). Initiation of an aquaculture of sponges for the sustainable production of bioactive metabolites in open systems: example, *Geodia cydonium*. *Marine Biotechnology*, 1(6), 569-579.

- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., & Nozaki, T. (2010). Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Experimental Parasitology*, 126(3), 337-347.

- Neveu, E., Khalifeh, D., Salamin, N., & Fasshauer, D. (2020). Prototypic SNARE proteins are encoded in the genomes of *Heimdallarchaeota*, potentially bridging the gap between the prokaryotes and eukaryotes. *Current Biology*, 30(13), 2468-2480.

- Nindiyasari, F., Ziegler, A., Griesshaber, E., Fernandez-Diaz, L., Huber, J., Walther, P., & Schmahl, W. W. (2015). Effect of hydrogel matrices on calcite crystal growth morphology, aggregate formation, and co-orientation in biomimetic experiments and biomineralization environments. *Crystal Growth & Design*, 15(6), 2667-2685.

- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., ... & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1), 19-30.

- Palmulli, R., & van Niel, G. (2018). To be or not to be... secreted as exosomes, a balance finely tuned by the mechanisms of biogenesis. *Essays in Biochemistry*, 62(2), 177-191.

- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Current Protocols in Bioinformatics*, 42(1), 3-1.

- Pereira-Leal, J. B., & Seabra, M. C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 889-901.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785-786.
- Pettersen Hessvik, N., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193-208.
- Rabouille, C. (2017). Pathways of unconventional protein secretion. *Trends in cell biology*, 27(3), 230-240.
- Ramachandran, A., Ravindran, S., Huang, C. C., & George, A. (2016). TGF beta receptor II interacting protein-1, an intracellular protein has an extracellular role as a modulator of matrix mineralization. *Scientific Reports*, 6(1), 1-16.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), 1574-1584.
- Rani, S., O'Brien, K., Kelleher, F. C., Corcoran, C., Germano, S., Radomski, M. W., ... & O'Driscoll, L. (2011). Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling. In *Gene expression profiling* (pp. 181-195). Humana Press.
- Ras-Carmona, A., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2021). Prediction of unconventional protein secretion by exosomes. *BMC bioinformatics*, 22(1), 1-13.
- Ravindran, S., Narayanan, K., Eapen, A. S., Hao, J., Ramachandran, A., Blond, S., & George, A. (2008). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP-78 mediates endocytosis of dentin matrix protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29658-29670.

- Rosset, E. M., Trombetta-eSilva, J., Hepfer, G., Yao, H., & Bradshaw, A. D. (2017). SPARC and the N-propeptide of collagen I influence fibroblast proliferation and collagen assembly in the periodontal ligament. *PLoS One*, 12(2), e0173209.

- Rousseau, M., Bédouet, L., Lati, E., Gasser, P., Le Ny, K., & Lopez, E. (2006). Restoration of stratum corneum with nacre lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 145(1), 1-9.

- Samain, J. F. (2011). Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquatic Living Resources*, 24(3), 227-236.

- Samson, R. Y., Obita, T., Freund, S. M., Williams, R. L., & Bell, S. D. (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science*, 322(5908), 1710-1713.

- Saunderson, S. C., Dunn, A. C., Crocker, P. R., & McLellan, A. D. (2014). CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123(2), 208-216.

- Shapiro, I. M., Landis, W. J., & Risbud, M. V. (2015). Matrix vesicles: are they anchored exosomes?. *Bone*, 79, 29-36.

- Shen, J., Zhao, Q., Wang, X., Gao, C., Zhu, Y., Zeng, Y., & Jiang, L. (2018). A plant Bro1 domain protein BRAF regulates multivesicular body biogenesis and membrane protein homeostasis. *Nature Communications*, 9(1), 1-15.

- Sillanpää, J. K., Ramesh, K., Melzner, F., Sundh, H., & Sundell, K. (2016). Calcium mobilisation following shell damage in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Genomics*, 27, 75-83.

- Sillanpää, J. K., Sundh, H., & Sundell, K. S. (2018). Calcium transfer across the outer mantle epithelium in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1891), 20181676.

- Sinha, S., Hoshino, D., Hong, N. H., Kirkbride, K. C., Grega-Larson, N. E., Seiki, M., ... & Weaver, A. M. (2016). Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *Journal of Cell Biology*, 214(2), 197-213.
- Sleight, V. A., Antczak, P., Falciani, F., & Clark, M. S. (2019). Computationally predicted gene regulatory networks in molluscan biomineralization identify extracellular matrix production and ion transportation pathways. *Bioinformatics*, 36(5), 1326-1332.
- Smith, Z. J., Lee, C., Rojalin, T., Carney, R. P., Hazari, S., Knudson, A., ... & Wachsmann-Hogiu, S. (2015). Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 28533.
- Sokolov, E. P., Markert, S., Hinzke, T., Hirschfeld, C., Becher, D., Ponsuksili, S., & Sokolova, I. M. (2019). Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics*, 194, 99-111.
- Song, L., & Florea, L. (2015). Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *GigaScience*, 4(1), s13742-015.
- Strand, Å., Waenerlund, A., & Lindegarth, S. (2011). High tolerance of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) to low temperatures. *Journal of Shellfish Research*, 30(3), 733-735.
- Sun, J., & Bhushan, B. (2012). Hierarchical structure and mechanical properties of nacre: a review. *RSC Advances*, 2(20), 7617-7632.
- Sun, R., Liu, Y., Lu, M., Ding, Q., Wang, P., Zhang, H., ... & Chen, S. (2019). ALIX increases protein content and protective function of iPSC-derived exosomes. *Journal of Molecular Medicine*, 97(6), 829-844.
- Surkont, J., & Pereira-Leal, J. B. (2016). Are there Rab GTPases in archaea?. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1833-1842.

- Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L., & Martin, G. R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 26(1), 99-105.
- Tester, C. C., Wu, C. H., Weigand, S., & Joester, D. (2012). Precipitation of ACC in liposomes—a model for biomineralization in confined volumes. *Faraday Discussions*, 159, 345-356.
- Theos, A. C., Truschel, S. T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D. C., Berson, J. F., ... & Marks, M. S. (2006). A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Developmental Cell*, 10(3), 343-354.
- Thouverey, C., Strzelecka-Kiliszek, A., Balcerzak, M., Buchet, R., & Pikula, S. (2009). Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(1), 127-138.
- Tonganunt, M., Phongdara, A., Chotigeat, W., & Fujise, K. (2005). Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Biotechnology*, 120(2), 135-145.
- Torres, V. I., Barrera, D. P., Varas-Godoy, M., Arancibia, D., & Inestrosa, N. C. (2021). Selective Surface and Intraluminal Localization of Wnt Ligands on Small Extracellular Vesicles Released by HT-22 Hippocampal Neurons. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2887.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., ... & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*, 121(2), 337-349.

- van Niel, G., d'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(4), 213-228.

- Wang, X., Li, L., Zhu, Y., Du, Y., Song, X., Chen, Y., ... & Zhang, G. (2013). Oyster shell proteins originate from multiple organs and their probable transport pathway to the shell formation front. *PloS One*, 8(6), e66522.

- Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., ... & Song, L. (2016). The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, 67, 221-228.

- Wang, M., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Jia, Z., Wang, L., & Wang, L. (2018). Transcriptomic analysis of exosomal shuttle mRNA in Pacific oyster *Crassostrea gigas* during bacterial stimulation. *Fish & Shellfish Immunology*, 74, 540-550.

- Wei, Y., Wang, D., Jin, F., Bian, Z., Li, L., Liang, H., ... & Zen, K. (2017). Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nature Communications*, 8(1), 1-12.

- Weiner, S., & Hood, L. (1975). Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation. *Science*, 190(4218), 987-989.

- Weiner, S., & Addadi, L. (2011). Crystallization pathways in biomineralization. *Annual Review of Materials Research*, 41, 21-40.

- Wemmer, M., Azmi, I., West, M., Davies, B., Katzmann, D., & Odorizzi, G. (2011). Bro1 binding to Snf7 regulates ESCRT-III membrane scission activity in yeast. *Journal of Cell Biology*, 192(2), 295-306.

- Wilt, F. H. (2005). Developmental biology meets materials science: morphogenesis of biomineralized structures. *Developmental Biology*, 280(1), 15-25.
- Wilt, F. H., Killian, C. E., Hamilton, P., & Croker, L. (2008). The dynamics of secretion during sea urchin embryonic skeleton formation. *Experimental Cell Research*, 314(8), 1744-1752.
- Woith, E., Fuhrmann, G., & Melzig, M. F. (2019). Extracellular vesicles—connecting kingdoms. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5695.
- Wollert, T., & Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464(7290), 864-869.
- Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H. J., Takahashi, N., & Simpson, R. J. (2016). Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1152-1162.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L. I., Luo, R., Xu, F., ... & Xiong, Z. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490(7418), 49-54.
- Zhao, R., Takeuchi, T., Luo, Y. J., Ishikawa, A., Kobayashi, T., Koyanagi, R., ... & Nagai, K. (2018). Dual gene repertoires for larval and adult shells reveal molecules essential for molluscan shell formation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(11), 2751-2761.
- Zimmermann, P., Zhang, Z., Degeest, G., Mortier, E., Leenaerts, I., Coomans, C., ... & David, G. (2005). Syndecan recycling is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Developmental cell*, 9(3), 377-388.

ANEXO

TABLA IV. Componentes proteicos de la concha de *C. gigas* encontrados como transportados a través de exosomas en la base de datos Exocarta.

Proteína	Gen
Dynein heavy chain 8, axonemal	DNAH8
Cullin-5	CUL5
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1
Catenin beta-1	CTNNB1
cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	CYFIP1
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5F1B
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1	SMARCD1
Eukaryotic initiation factor 4A-II	Eif4a2
Rho GTPase-activating protein 45	ARHGAP45
E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	HERC2
Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 1	PPIP5K1
Choline-phosphate cytidylyltransferase B	PCYT1B
Girdin	CCDC88A
T-complex protein 1 subunit delta	CCT4
Exocyst complex component 5	EXOC5
Neurofibromin	NF1
Kinesin-like protein KIF15	KIF15
Peripherin-2	PRPH2
Cartilage-associated protein	Crtap
Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA
Axin-1	AXIN1
Zinc finger protein 845	ZNF845
Tubulin beta-3 chain	TUBB3
GTP-binding nuclear protein Ran	RAN
Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 2	KLRG2
Transaldolase	TALDO1
Myosin-1	MYH1
E3 ubiquitin-protein ligase UBR1	UBR1
Neuron navigator 3	NAV3
CD109 antigen	CD109
Cysteine-rich protein 2-binding protein	KAT14
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5F1A
Chitinase-3-like protein 1	CHI3L1
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	VPS13C
Heat shock 70 kDa protein 13	HSPA13
FH1/FH2 domain-containing protein 3	FHOD3
Unconventional myosin-Ib	MYO1B
Phosphoglucomutase-2	PGM2
DnaJ homolog subfamily B member 11	Dnajb11
Probable ATP-dependent RNA helicase DHX34	DHX34
Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog	VPS16
Protein FAM193A	FAM193A
Histone-lysine N-methyltransferase 2A	KMT2A
Protein HID1	HID1
Ceramide glucosyltransferase	UGCG
Cytospin-A	SPECC1L